



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO DE ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**Recursos genéticos de los “Hongos del Maguey” (*Pleurotus* sp.)
de la región central de México: caracterización y selección de
genotipos con potencial para la producción rural**

ANGELINA PATRICIA RAMÍREZ CARRASCO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2010



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUE-43-2-03 ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Angelina Patricia Ramírez Carrasco** alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Recursos genéticos de los "Hongos del Maguey" (*Pleurotus* sp.) de la región central de México: caracterización y selección de genotipos con potencial para la producción rural.** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla 17 de noviembre de 2010.

M.C. Angelina Patricia Ramírez Carrasco

Vo. Bo.

Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera
Profesor Consejero

La presente tesis intitulada: **Recursos genéticos de los “Hongos del Maguey” (*Pleurotus* sp.) de la región central de México: caracterización y selección de genotipos con potencial para la producción rural**; realizada por la alumna: **Angelina Patricia Ramírez Carrasco**; bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. MIGUEL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

ASESOR:



DR. LEOBARDO SERRANO CARREÓN

Puebla, Puebla, México, 3 de diciembre de 2010

RECURSOS GENÉTICOS DE LOS “HONGOS DEL MAGUEY” (*PLEUROTUS* SP.) DE LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO: CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE GENOTIPOS CON POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN RURAL

Angelina Patricia Ramírez Carrasco, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2010.

México cuenta con una gran diversidad biológica, sin embargo, poco se han aprovechado los recursos genéticos nativos para la producción comercial de hongos comestibles. En esta investigación se recolectaron y caracterizaron diversos genotipos de *Pleurotus* que crecían silvestres sobre plantas de *Agave* en el altiplano de la región central de México. Estos hongos comestibles son consumidos por las comunidades locales durante la época de lluvias, a los cuales denominan como “Hongos del Maguey”. Se aislaron 25 cepas de estos hongos que se caracterizaron macro y microscópicamente, y se evaluó su competitividad comercial. La más alta eficiencia biológica (EB) y tasa de producción (TP) se registraron en la cepa CP-460 (58.04% y 1.0748, respectivamente), las cuales fueron equivalentes a las cepas comerciales de referencia. La producción de lacasas de la cepa CP-460 fue de 142.86 U/ml, a las 96 h de crecimiento micelial, representando un nivel intermedio con respecto a las cepas de referencia. El análisis molecular de la región ITS del ADNr demostró la presencia de tres sublinajes principales y cinco grupos filogenéticos para las poblaciones de *Pleurotus* que crecen naturalmente sobre *Agave*. La diversidad morfológica y genética de dichas poblaciones indicó la presencia de una especie nueva de *Pleurotus*, adaptada al desarrollo sobre un substrato específico y endémica del altiplano mexicano. El co-cultivo de las cepas CP-363, CP-460, y CP-517 de *Pleurotus* sp. con *Trichoderma aggressivum* var. *aggressivum* demostró que es factible obtener cepas de *Pleurotus* con resistencia genética natural al ataque del “moho verde” agresivo. Los “Hongos del Maguey” pueden ser aprovechados por las comunidades rurales de México, campesinas e indígenas, tanto en la alimentación como en la generación de ingreso, a través de estrategias adecuadas de transferencia de tecnología.

Palabras clave: *Pleurotus*, “Hongos del Maguey”, *Trichoderma*, cultivo de hongos comestibles, desarrollo rural, países en desarrollo.

GENETIC RESOURCES OF “MAGUEY MUSHROOMS” (*PLEUROTUS* SP.) FROM THE CENTRAL REGION OF MEXICO: CHARACTERIZATION AND SELECTION OF GENOTYPES SHOWING POTENTIAL FOR RURAL PRODUCTION

Angelina Patricia Ramírez Carrasco, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2010.

Mexico has a great biological diversity; however, native genetic resources have been poorly managed for the commercial production of edible mushrooms. In this research, diverse *Pleurotus* genotypes growing wild on *Agave* plants in central highlands of Mexico were collected and characterized. These edible mushrooms, commonly known as “Maguey Mushrooms”, are consumed by local communities during the rainy season. Twenty five strains were isolated, macro and microscopically characterized, and their commercial competitiveness assessed. The highest biological efficiency (EB) and production rate (TP) were recorded in the strain CP-460 (58.04% and 1.0748, respectively), which were equivalent to those from commercial reference strains. Laccases production by the strain CP-460 was 142.86 U/ml, after 96 h of mycelial growth, representing an intermediate value in comparison with reference strains. Molecular analysis of the ITS region from the rDNA showed three main lineages, as well as five phylogenetic groups, for the *Pleurotus* populations growing wild on *Agave* plants. Morphological and genetic diversity of those populations indicated a new *Pleurotus* species adapted to a specific substrate and endemic of Mexican central highlands. Co-cultures between the strains CP-363, CP-460, and CP-517 of *Pleurotus* sp. and *Trichoderma aggressivum* var. *aggressivum* showed the possibility to find natural genetic resistance in *Pleurotus* species against the aggressive “green mold” attack. “Maguey Mushrooms” can be cultivated by rural peasant communities in Mexico not only for own consumption, but also for generating household income, through suitable strategies of technology transfer.

Key words: *Pleurotus*, “Maguey Mushrooms”, *Trichoderma*, edible mushroom cultivation, rural development, developing countries.

DEDICATORIAS

Con cariño:

A Dios:

Por permitirme llegar a este momento, porque siempre estuvo conmigo en los momentos más difíciles, y porque me permitió apreciar parte de su creación en los maravillosos microorganismos con los que trabajé

A la Memoria de mi Papá:

Dr. Thomas Ramírez Hernández

Quien siempre me dio ejemplo de nobleza, respeto, educación y superación personal.

A mi querida Mamá:

Elvira J. Carrasco Vda. De Ramírez

Quien siempre ha luchado por darme lo mejor, y ha sido un ejemplo de rectitud y constancia, y por todo su cariño con el que me ha formado. Y porque siempre ha sido partícipe de mi desarrollo personal.

A mi hermano:

Eduardo

Con quien he compartido muchos increíbles días, y a quien agradezco su gran paciencia, cariño, y dedicación a mi superación, por sus múltiples enseñanzas, y por estar presente en los momentos más difíciles.

A la Memoria de mis Abuelitos:

José Carrasco Guzmán y Zeferina Cano Bello

A la Familia McTabby:

Por el cariño y amistad sinceros que siempre han mostrado.

A mis amigos y compañeros del Centro Escolar Aparicio.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico brindado para poder realizar mis estudios.

Al Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla por haberme admitido en el Programa en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional, para realizar el Doctorado en Ciencias.

Al Dr. Daniel Martínez Carrera por haberme brindado la oportunidad de realizar la presente investigación en el área de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales. De igual forma por su sincera amistad y tiempo; y por sus valiosas enseñanzas académicas y personales, y por alentarme con su ejemplo a ser mejor.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM *Campus* Cuernavaca por todas las facilidades para realizar mi estancia.

Al Dr. Leobardo Serrano Carreón por la excelente capacitación y asesoría sobre las determinaciones enzimáticas.

Al Dr. Porfirio Morales Almora por su amistad y por compartir sus conocimientos, y por sus valiosas y oportunas observaciones al presente trabajo.

A la Dra. Mercedes Sobal Cruz por los valiosos comentarios y revisión al presente escrito.

Al Dr. Miguel Sánchez Hernández por su admirable gran vocación, por ser un maestro que enseña a conciencia, y por sus oportunas observaciones al presente trabajo.

Al personal del Departamento de Computación del Colegio de Postgraduados, por su valiosísima asesoría y auxilio técnico.

A todo el cuerpo administrativo del Colegio de Postgraduados, en especial a Lupita Peral, Malú y Alejandro por su apoyo.

A todos los profesores del Colegio de Postgraduados que participaron en mi formación.

A mis amigas y maestras del IBT: M.C. Celia Flores Ocampo, I.Q. Rocio Casasanero Orduña y M.C. Alicia Contreras Ordoñez, por su asesoría y comentarios.

Y a todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, que me apoyaron en algún momento, para el desarrollo de mi trabajo de investigación, en especial a la M.C. Myrna Bonilla Quintero, al Dr. Isaac Tello Salgado y al Biol. Wilfrido Martínez Sánchez.

CONTENIDO

Página

I. INTRODUCCIÓN	1	
II. REVISIÓN DE LITERATURA		
2.1	Los hongos como recurso genético y su conservación	2
2.1.1	Concepto de recurso genético	2
2.1.2	Antecedentes históricos	3
2.1.3	Biodiversidad	4
2.1.4	Importancia de la conservación	7
2.1.5	Conservación de recursos genéticos de hongos	7
2.1.5.1	Los hongos y estudio de su diversidad	8
2.2	Hongos comestibles y medicinales	10
2.3	El cultivo de hongos	14
2.3.1	El cultivo de <i>Pleurotus</i> spp.	15
2.3.2	El género <i>Pleurotus</i>	16
2.3.3	Especiación en <i>Pleurotus</i>	17
2.3.4	Morfología de los esporóforos	19
2.3.5	Especies cultivadas de <i>Pleurotus</i>	19
2.3.6	Ciclo de Vida	20
2.3.8	Patrones de sexualidad	20
2.4	Enfermedades y plagas de los hongos comestibles	21
2.4.1	Mohos verdes	24
2.4.1.1	Descripción de <i>Trichoderma</i>	25
2.4.1.1.1	Clasificación de <i>Trichoderma</i>	26
2.4.1.1.2	Desarrollo de cepas patógenas de <i>Trichoderma aggressivum</i>	27
2.4.1.1.3	Transmisión de la infección	30
2.4.1.1.4	Identificación molecular del “moho verde”	30
2.4.1.1.5	Interacción hongos comestibles- <i>Trichoderma</i>	32
2.4.1.1.6	Control de <i>Trichoderma</i>	32
2.4.2	Control y Selectividad	33
2.5	Nutrición de los hongos	35
2.5.1	Degradación de polímeros	35

2.5.2.	Modo de degradación por los hongos de “pudrición blanca”	37
2.6	Lacasas	39
2.6.1	Función fisiológica de las lacasas	40
2.6.2	Aplicaciones de las lacasas	40
2.6.3	Lacasas y la interacción entre microorganismos	41
2.7	<i>Pleurotus</i> y enzimas	42
2.7.1	<i>Pleurotus</i> , enzimas y otros microorganismos	43
2.7.2	Estimulación de producción de enzimas por desechos lignocelulósicos	44
2.8	Panorama general del cultivo de <i>Pleurotus</i> en México	45
2.8.1	Recursos genéticos de hongos	45
2.8.1.1	Recursos genéticos de <i>Pleurotus</i>	47
2.8.2	Avances del cultivo	48
2.8.3	Dificultades encontradas en el cultivo	49
2.8.3.1	El problema de las plagas y enfermedades en México	50
2.8.4	Selección y mejoramiento genético	52
2.9	La cultura y los hongos comestibles	53
2.9.1	La producción de hongos comestibles y la transformación cultural	55
III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN		56
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		57
V. METODOLOGÍA		58
5.1.	Recolección de recursos genéticos de hongos comestibles y cepas de mohos	59
5.2.	Caracterización clásica	59
5.2.1.	Características macroscópicas y microscópicas de las cepas estudiadas	59
5.2.2.	Determinación de la tasa de desarrollo (TD)	61
5.2.3.	Evaluación de la competitividad comercial a nivel módulo experimental	61
5.2.4.	Características organolépticas	63
5.2.4.1.	Prueba preliminar de las características organolépticas	63
5.2.4.2	Prueba grupal de las características organolépticas (exploratoria de las preferencias)	63

5.3.	Caracterización enzimática	64
5.3.1.	Evaluación de la producción de lacasas por <i>Pleurotus</i>	64
5.3.1.1.	Preparación de materiales y medio líquido	64
5.3.1.2.	Inoculación del medio líquido	65
5.3.1.3.	Obtención del inóculo	65
5.3.1.4.	Incubación y extracción de la enzima lacasa	66
5.3.1.5.	Preparación de reactivos	66
5.3.1.6.	Determinación espectrofotométrica de la lacasa	67
5.3.1.7.	Determinación de la actividad volumétrica	69
5.3.2.	Determinación de biomasa	70
5.3.3.	Determinación de la producción de proteína extracelular	71
5.3.4.	Determinación de la actividad enzimática de lacasas en medio de agar al confrontar <i>Pleurotus</i> y <i>Trichoderma aggressivum</i> (PAGE)	74
5.3.5.	Electroforesis de lacasas producidas por <i>Pleurotus</i>	74
5.3.5.1	Preparación de los geles	74
5.3.5.2	Preparación de las muestras	75
5.4.	Caracterización molecular	76
5.4.1.	Análisis a nivel molecular de la región ITS del ADNr de las cepas de <i>Pleurotus</i>	76
5.4.1.1.	Cultivo de las cepas en medio líquido y cosecha del micelio	76
5.4.1.2.	Liofilización del micelio	77
5.4.1.3	Extracción del ADN	77
5.4.1.4.	Calidad y cantidad del ADN extraído	78
5.4.1.5.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la región ITS del ADNr	79
5.4.1.6.	Purificación y secuenciación de los productos de PCR	80
5.4.1.7.	Análisis de las secuencias de ADN	80
5.4.2.	Estudio de las cepas de <i>Trichoderma</i>	80
5.4.2.1.	Procedimiento para la eliminación de bacterias que contaminan las cepas de <i>Trichoderma</i>	81
5.4.2.2.	Mantenimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i>	81
5.5.	Confrontación de <i>Pleurotus</i> y <i>Trichoderma</i>	81

5.6.	Análisis estadístico	84
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		85
6.1.	Caracterización de las cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	85
6.1.1.	Caracterización microscópica y macroscópica micelial de las cepas estudiadas	85
6.1.2.	Determinación de la tasa de desarrollo en diferentes medios de cultivo	86
6.1.3.	Evaluación de la competitividad comercial a nivel módulo experimental	90
6.1.3.1	Primera fructificación	90
6.1.3.2	Segunda fructificación	95
6.1.4.	Caracterización organoléptica	99
6.1.4.1.	Prueba preliminar de las características organolépticas	99
6.1.4.2.	Evaluación exploratoria de aceptación por consumidores	102
6.1.4.2.1.	Preferencia de compra	102
6.1.4.2.2.	Evaluación exploratoria de las propiedades organolépticas de las cepas de <i>Pleurotus</i> por consumidores no expertos	103
6.1.5.	Aspectos relevantes de la caracterización de <i>Pleurotus</i>	105
6.1.6.	Caracterización enzimática de las cepas de <i>Pleurotus</i>	107
6.1.6.1.	Determinación de la cinética de lacasas de las cepas seleccionadas	107
6.1.6.2.	Determinación de biomasa de las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i>	113
6.1.6.3.	Producción de proteínas en medio líquido de las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i>	113
6.1.6.4.	Determinación de la actividad enzimática de lacasas en medio de agar de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-50) y de <i>Trichoderma aggressivum</i> (CPM-64)	114
6.1.7.	Análisis a nivel molecular de las cepas de <i>Pleurotus</i>	116
6.2.	Caracterización de las cepas de <i>Trichoderma</i>	121
6.2.1.	Caracterización microscópica y macroscópica micelial	121
6.2.2.	Determinación de la tasa de desarrollo	124
6.2.3.	Eliminación de bacterias asociadas a las cepas de <i>Trichoderma</i>	125
6.2.4.	Mantenimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i>	127
6.2.5.	Análisis molecular de las cepas de <i>Trichoderma</i>	129

6.3.	Evaluación de la confrontación de las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> vs. <i>Trichoderma</i>	131
6.3.1.	Tasa de desarrollo y halos de producción enzimática de <i>Pleurotus</i> y <i>Trichoderma</i> en PDA a pH 5.6	132
6.3.2.	Esporulación de <i>Trichoderma</i> (CPM-112) en los co-cultivos con <i>Pleurotus</i>	135
6.3.3.	Tasa de desarrollo y halos de producción enzimática de <i>Pleurotus</i> y <i>Trichoderma</i> en PDA a pH 11	136
6.3.4.	Tasa de desarrollo y halos de producción enzimática de <i>Pleurotus</i> y <i>Trichoderma</i> en PDA a pH 5.6 y 11 (segundo experimento)	137
VII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	141
VIII.	ESTRATEGIA PROPUESTA PARA EL APROVECHAMIENTO Y USO DE LOS RECURSOS MICOLÓGICOS DE LAS CEPAS DE <i>PLEUROTUS</i> AISLADAS DE MAGUEY	142
IX.	EVALUACIÓN DE HIPÓTESIS	147
	BIBLIOGRAFÍA	148

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 2.1.	Composición proximal de especies cultivadas de hongos comestibles	10
Tabla 2.2.	Contenido de vitaminas y minerales de algunos hongos comestibles cultivados	11
Tabla 2.3.	Grupos de interesterilidad en <i>Pleurotus</i> . Lista de grupos de interesterilidad actualmente conocidos (especies biológicas) en <i>Pleurotus</i> junto con datos sobre sus distribuciones	17
Tabla 2.5.	Principales características diferenciales entre especies de <i>Trichoderma</i> a los 4 días de cultivo en Agar Malta	30
Tabla 5.1.	Cepas de <i>Pleurotus</i> spp. aisladas de maguey y cepas de referencia consideradas en el presente estudio.	60
Tabla 5.2.	Cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas de muestras de sustrato contaminado procedente de plantas productoras de hongos comestibles de diversos Estados del país.	61
Tabla 5.2.	Composición de la fórmula COLPOS 17 y su porcentaje en peso húmedo y peso seco y las cantidades necesarias para preparar 80 kilos del sustrato en peso seco de dicha fórmula.	62
Tabla 5.3.	Componentes de la mezcla de reacción para realizar el corrimiento electroforético de las muestras que se extrajeron de ADN.	65
Tabla 5.4.	Componentes de la mezcla de reacción para realizar la amplificación de la región ITS	66
Tabla 5.5.	Cepas seleccionadas como pertenecientes al género <i>Trichoderma</i> spp. depositadas en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) Sección: Competidores.	68
Tabla 5.6.	Substratos empleados para la evaluación enzimática, considerando concentración, peso molecular, solvente y longitud de onda para su lectura al espectrofotómetro	75
Tabla 5.7.	Relación de los componentes de la mezcla de reacción usada para evaluar la concentración enzimática en el espectrofotómetro, considerando el blanco y la muestra.	76
Tabla 5.8.	Componentes de la mezcla de reacción utilizados para evaluar la concentración enzimática en las muestras de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , dependiendo del sustrato.	76
Tabla 5.9.	Componentes de la mezcla de reacción utilizados para evaluar la concentración enzimática en las muestras de la cepa CP-253 de <i>Pleurotus djamor</i> , dependiendo del sustrato.	77
Tabla 5.10.	Concentración de las soluciones estándar de albúmina bovina.	79
Tabla 5.11.	Componentes necesarios para preparar las mezclas de reacción de los estándares y el blanco para determinar espectrofotométricamente la curva de calibración de proteína ($\lambda = 595$ nm).	80

Tabla 5.12.	Componentes necesarios para preparar las mezclas de reacción de los estándares, el blanco y de las muestras para determinar espectrofotométricamente la concentración de proteína de las muestras ($\lambda = 595$ nm).	81
Tabla 5.13.	Componentes de la mezcla de reacción utilizados para evaluar la concentración enzimática en las muestras de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , CPM-64 de <i>Trichoderma aggressivum</i> y el cultivo de ambas en medio sólido, dependiendo del sustrato.	82
Tabla 5.14.	Componentes necesarios para la preparación de geles de acrilamida: Gel separador y gel concentrador.	83
Tabla 6.1.	Caracterización microscópica de 19 cepas de <i>Pleurotus</i> silvestres comparadas con una cepa comercial de referencia (CP-50)	86
Tabla 6.2.	Caracterización de 27 cepas de <i>Pleurotus</i> spp. en 3 medios de cultivo: Agar papa dextrosa (PDA), medio completo (CYM) y agar extracto de malta (EMA)	87
Tabla 6.3.	Caracterización morfológica macroscópica de las cepas de <i>Pleurotus</i> de referencia estudiadas, cultivadas en medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA), medio de levadura completo (CYM) y agar con extracto de malta (EMA)(23°C, n=3)	88
Tabla 6.4.	Caracterización morfológica macroscópica de las cepas de <i>Pleurotus</i> aisladas de maguey estudiadas, cultivadas en medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA), medio de levadura completo (CYM) y agar con extracto de malta (EMA)(23°C, n=3).	88
Tabla 6.5.	Períodos de tiempo registrados en la fase de producción (1ª. Fructificación), número de cosechas y eficiencia biológica de 20 cepas de <i>Pleurotus</i> .	92
Tabla 6.6.	Estimación de la proporción de bacterias, mohos competidores e insectos en las unidades de producción de las cepas de <i>Pleurotus</i> estudiadas.	93
Tabla 6.7.	Períodos en la fase de producción, a partir de la inoculación, correspondientes al número de cosechas, eficiencia biológica (EB), y tasa de producción (TP) de la segunda fructificación de las cepas estudiadas de <i>Pleurotus</i> .	96
Tabla 6.8.	Comparación de las cepas estudiadas de <i>Pleurotus</i> consideradas competitivas con aquellas de referencia, en relación a los parámetros evaluados. Los datos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.	99
Tabla 6.9.	Características organolépticas de las cepas de <i>Pleurotus</i> estudiadas en prueba preliminar.	101
Tabla 6.10.	Comparación de las cepas estudiadas de <i>Pleurotus</i> con aquellas de referencia, en lo que respecta a los parámetros evaluados de producción y propiedades.	102
Tabla 6.11.	Preferencia de compra (%) por apariencia de las fructificaciones (<i>Pleurotus</i>) por parte de consumidores no expertos, tomando como referencia dos cepas comerciales.	103

Tabla 6.12.	Evaluación del olor por parte del consumidor final, de cuatro cepas de <i>Pleurotus</i> de maguey y una cepa comercial, considerando una escala de nueve categorías, según Anzaldúa (2005).	104
Tabla 6.13.	Evaluación del sabor por parte del consumidor final, de cuatro cepas de <i>Pleurotus</i> de maguey y una cepa comercial, considerando una escala de nueve categorías, según Anzaldúa (2005).	104
Tabla 6.14.	Evaluación de la consistencia por parte del consumidor final, de cuatro cepas de <i>Pleurotus</i> de maguey y una cepa comercial, considerando una escala de nueve categorías, según Anzaldúa (2005)	105
Tabla 6.15.	Cepas que destacaron en los siete criterios de producción, y análisis exploratorio de las propiedades organolépticas y preferencia de consumidores no expertos.	106
Tabla 6.16.	Actividad volumétrica (AV) de lacasas de las cepas de referencia de <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-50) y <i>P. djamor</i> (CP-253), en comparación con una cepa seleccionada de los “Hongos del Maguey” (<i>Pleurotus</i> sp.; CP-460).	108
Tabla 6.17.	Actividad volumétrica (AV) de lacasas (U/ml) en medio de agar con extracto de malta de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i> y CPM-64 de <i>Trichoderma aggressivum</i> .	115
Tabla 6.18.	Caracterización macroscópica y microscópica general de “mohos verdes” contaminantes de cultivos de hongos comestibles.	121
Tabla 6.19.	Caracterización macroscópica y microscópica general de cepas de “mohos verdes” contaminantes de cultivos de hongos comestibles.	122
Tabla 6.20.	Cepas seleccionadas tentativamente pertenecientes al género <i>Trichoderma</i> , aisladas de muestras de sustrato contaminado procedente de plantas productoras de hongos comestibles de diversos Estados del país.	123
Tabla 6.21.	Tasa de desarrollo (TD \pm error estándar) de las cepas de <i>Trichoderma</i> seleccionadas, las cuales fueron aisladas de plantas productoras de hongos comestibles. Condición de incubación: 28°C.	124
Tabla 6.22.	Evaluación de los tratamientos con cloranfenicol para eliminar las bacterias contaminantes asociadas a los cultivos de <i>Trichoderma</i> . (dosis: 0.1, 0.3, 0.5 mg/ml)	126
Tabla 6.23.	Determinación del tiempo de conservación de las cepas de <i>Trichoderma</i> tomando <i>pellets</i> de matraces con medio completo líquido con extracto de levadura (CYM), con cloranfenicol (MCC) y sin cloranfenicol (MSC). Las cepas se recuperaron en agar con dextrosa y papa (PDA) por 48-96 h a los cinco y ocho meses de conservación.	129
Tabla 6.24.	Tasa de desarrollo y halo enzimático de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6) de las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> y <i>Trichoderma</i> (controles). Evaluación al tercer día de la inoculación.	132

Tabla 6.25.	Tasa de desarrollo y halo enzimático de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6) de los co-cultivos entre las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> vs. <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (controles). Evaluación al tercer día de la inoculación.	133
Tabla 6.26.	Distancia limitante de confrontación (DLC) en los co-cultivos entre las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> vs. <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-112) en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto día de la inoculación.	134
Tabla 6.27.	Análisis comparativo de la esporulación (número de conidiosporas \pm error estándar) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-112) en tres zonas de muestreo de los co-cultivos con las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto día de la inoculación.	135
Tabla 6.28.	Tasa de desarrollo y halo enzimático de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH inicial= 11) de las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> (tratamiento). Evaluación al día 18 de la inoculación.	136
Tabla 6.29.	Tasa de desarrollo y halo enzimático de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH inicial= 5.6 y 11) de las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> y su confrontación con <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (controles y tratamientos). Evaluación al día 13 de la inoculación.	138

LISTA DE FIGURAS

	Página	
Figura 5.1.	Esquema de trabajo realizado para la caracterización y selección de las cepas de <i>Pleurotus</i> spp. aisladas de cuerpos fructíferos que crecen sobre el maguey, proporcionadas por el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del COLPOS, Campus Puebla.	59
Figura 5.2.	Proceso de cosecha del micelio de <i>Trichoderma</i> para estudios moleculares	77
Figura 5.3.	Esquema del experimento realizado para confrontar las cepas de <i>Pleurotus</i> seleccionadas con <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-112).	83
Figura 5.4.	Zonas de muestreo para evaluar la esporulación de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-112) en confrontación con las cepas seleccionadas de <i>Pleurotus</i> .	83
Figura 6.1.	Observación microscópica del micelio de las cepas de <i>Pleurotus</i> estudiadas: a: Fíbulas en una preparación regular, y b: Estructuras en forma de perilla con pedúnculo presentes en algunas de las cepas.	85
Figura 6.2.	Crecimiento característico de las cepas de <i>Pleurotus</i> estudiadas. a: La cepa CP-358 desarrollándose sobre agar con papa dextrosa (PDA), medio completo con extracto de levadura (CYM) y agar con extracto de malta (EMA); y b: Morfología macroscópica de diferentes cepas estudiadas (CYM).	90

Figura 6.3.	Fructificaciones de las cepas de <i>Pleurotus</i> spp. que obtuvieron los mejores resultados en comparación con la cepa comercial: a). CP-50 (cepa de referencia), b). CP-362 con fructificaciones color crema y c). CP-460 con fructificaciones de color amarillento	91
Figura 6.4.	Principales condiciones ambientales registradas durante la primera fructificación de las cepas de <i>Pleurotus</i> . a: Temperaturas máximas (15-27°C) y mínimas (11-15°C). b: Humedad relativa (32-89%).	91
Figura 6.5.	Características de la etapa larval vista al microscópio estereoscópico del insecto lepidóptero que afecto las fructificaciones de las cepas estudiadas de <i>Pleurotus</i> . Las larvas midieron aproximadamente 10-12 mm de largo.	94
Figura 6.6.	Diferentes etapas de los insectos (Orden: Lepidoptera, Género: <i>Plodia</i> sp.) que causaron serios daños a la cepa CP-460 de <i>Pleurotus</i> sp. durante la primera fructificación. a: Larva que generó túneles en el interior del estípite. b: Daño causado por larvas en todo el cuerpo fructífero. c: Pupa enterrada en el cuerpo fructífero y pupas completas a los lados. d: Imago.	95
Figura 6.7.	Condiciones ambientales registradas en el módulo experimental durante la segunda fructificación de las cepas estudiadas de <i>Pleurotus</i> . a: Temperaturas (16-20oC). b: Humedad relativa (45-80%).	95
Figura 6.8.	Media y error estándar de los parámetros evaluados sobre la competitividad comercial de la segunda fructificación de las cepas estudiadas de <i>Pleurotus</i> : a). Eficiencia biológica (EB%); b). Tiempo para obtener la última cosecha (TUC) y e). Tasa de producción (TP)	97
Figura 6.9.	Evaluación de la actividad volumétrica (AV) de lacasas utilizando DMP: a: Cinética de las cepas CP-50, CP-253 y CP-460 de <i>Pleurotus</i> . b: Corrimiento electroforético (PAGE).	109
Figura 6.10.	Evaluación de la actividad volumétrica de lacasas utilizando Siringaldazina (SYR). a: Cinética de las cepas CP-50 y CP-253 de <i>Pleurotus</i> . b: Corrimiento electroforético (PAGE).	110
Figura 6.11.	Evaluación de la actividad volumétrica de lacasas utilizando ABTS. a: Cinética de las cepas CP-50 y CP-253 de <i>Pleurotus</i> . b: Corrimiento electroforético (PAGE).	111
Figura 6.12.	Evaluación de la actividad volumétrica de lacasas utilizando guayacol: a: Cinética de las cepas CP-50 y CP-253 de <i>Pleurotus</i> ; b: Corrimiento electroforético (PAGE).	112
Figura 6.13.	Biomasa producida por las cepas CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y CP-253 de <i>P. djamor</i> en extracto de malta líquido (EML). a: Perfil de la producción de biomasa. b: Datos cuantitativos (experimentos independientes).	113
Figura 6.14.	Producción de proteína de las cepas CP-50 (<i>Pleurotus ostreatus</i>), CP-253 (<i>P. djamor</i>) y CP-460 (<i>P. sp.</i>) en extracto de malta líquido (EML). a: Perfil de la producción de biomasa. b: Datos cuantitativos.	114

Figura 6.15.	Corrimiento electroforético de las proteínas de sobrenadante del co-cultivo de la cepa CP-50 vs. CPM-64, y las cepas control [carriles de la derecha: <i>Trichoderma</i> (T), <i>Pleurotus</i> (P), <i>Pleurotus</i> vs. <i>Trichoderma</i> (P/T)], revelando las bandas con los substratos DMP, SYR, ABTS y GY.	115
Figura 6.16.	Evaluación de la cantidad y calidad del ADN extraído del micelio de algunas cepas estudiadas de <i>Pleurotus</i> .	116
Figura 6.17.	Evaluación de la cantidad y calidad del producto de PCR de la región ITS del ADNr, tanto amplificado (a) como purificado (b).	116
Figura 6.18.	Árbol generado por análisis de <i>Neighbor Joining</i> de las secuencias ITS1-5.8s-ITS2 de las cepas de <i>Pleurotus</i> estudiadas y aquellas de referencia. La suma de las longitudes de las ramas en el árbol óptimo resultó de 6.02951674. Los códigos de cada cepa corresponden al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC), o al banco de datos del <i>European Bioinformatics Institute</i> (Gene Bank: EBML-EBI; www.ebi.ac.uk/).	117
Figura 6.19.	Matriz de distancia genética generada por el método de <i>Neighbor-Joining</i> mediante el programa MEGA4.	118
Figura 6.20.	Árbol consenso generado por el análisis de máxima parsimonia, analizando las secuencias ITS1-5.8s-ITS2 de las cepas de <i>Pleurotus</i> estudiadas y aquellas de referencia. Índices del árbol: Índice de consistencia (CI)= 0.846154 e índice de retención (RI)= 0.935484. Los valores de <i>bootstrap</i> se muestran arriba de las ramas (1,000 réplicas). Los códigos de cada cepa corresponden al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC), o al banco de datos del <i>European Bioinformatics Institute</i> (Gene Bank: EBML-EBI; www.ebi.ac.uk/).	120
Figura 6.21.	Fiálides de <i>Trichoderma</i> de las cepas: a: CPM-109. b: CPM-110. c: CPM-112.	123
Figura 6.22.	Colonias de <i>Trichoderma</i> creciendo sobre diferentes medios de cultivo: medio completo con extracto de levadura (CYM), agar con papa y dextrosa (PDA), y agar con extracto de malta (EMA). a: CPM-38. b: CPM-113.	125
Figura 6.23.	Obtención de cultivo puro de <i>Trichoderma</i> en agar con papa y dextrosa más cloranfenicol. a: Cepa CPM-103 con bacterias. b: Cultivo axénico.	126
Figura 6.24.	Cepa CPM-103 de <i>Trichoderma</i> contaminada por bacterias asociadas. a: Medio completo líquido con extracto de levadura (CYM), a las 48 h de inoculación con la cepa CPM-103. b: Eliminación de la biomasa para evaluar la presencia o ausencia de contaminación bacteriana.	127
Figura 6.25.	Ejemplos de variabilidad de los <i>pellets</i> producidos en medio completo líquido con extracto de levadura (CYM) por las cepas de <i>Trichoderma</i> : CPM-111 (a), CPM-112 (b), y CPM-113 (c).	128

- Figura 6.26.** Dendrograma de las cepas estudiadas de *Trichoderma*, generado por el método de *Neighbor Joining*, a partir del análisis de las secuencias de la región ITS (ITS1-5.8s-ITS2) del ADNr. Los códigos de cada cepa corresponden al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC), o al banco de datos del *European Bioinformatics Institute* (Gene Bank: EBML-EBI; www.ebi.ac.uk/). 130
- Figura 6.27.** Prueba cualitativa de la producción de lacasas al tercer día de inoculación con las cepas seleccionadas de *Pleurotus* en medio de agar con dextrosa y papa (PDA), a un pH inicial de 5.6 y 11, tanto en controles como en los tratamientos. El co-cultivo fue con *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112). 131
- Figura 6.28.** Comparación de la tasa de desarrollo de los co-cultivos entre las cepas seleccionadas de *Pleurotus* vs. *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112) en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al tercer día de la inoculación. 133
- Figura 6.29.** Respuesta diferenciada de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* al confrontarse con *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112), las cuales muestran el halo de producción enzimática de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto día de la inoculación. **a:** CP-50 vs. CPM-112. **b:** CP-517 vs. CPM-112. **c:** CP-460 vs. CPM-112. **d:** CP-363 vs. CPM-112. 134
- Figura 6.30.** Esporulación de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112) en tres zonas de muestreo de los co-cultivos con las cepas seleccionadas de *Pleurotus* en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto día de la inoculación. 135
- Figura 6.31.** Halo de producción enzimática de las cepas seleccionadas de *Pleurotus*, CP-50 (izquierda), CP-517 (centro) y CP-460 (derecha), sometidas a una condición extrema en agar con dextrosa y papa con pH 11, a 18 días de la inoculación. 130
- Figura 6.32.** Respuesta diferenciada de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* al cultivarse en condición extrema de pH 11, tanto solas como en confrontación con *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112). Tanto en los controles (pH 5.6) como en los tratamientos (pH 11), las colonia muestran el halo de producción enzimática de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al día 13 de la inoculación. **a:** Tratamiento pH 11, co-cultivos CP-50 vs. CPM-112 (izquierda), CP-517 vs. CPM-112 (centro), y CP-460 vs. CPM-112 (derecha). **b:** Tratamiento pH 11, cultivo de las cepas CP-50 (izquierda), CP-517 (centro), y CP-460 (derecha). **c:** Control pH 5.6, cultivo de las cepas CP-50 (izquierda), CP-517 (centro), y CP-460 (derecha). 139
- Figura 6.33.** Respuesta diferenciada de las cepas del “moho verde” de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112), tanto en el control (pH 5.6, izquierda) como en el tratamiento a condición extrema de pH 11 (derecha), al día 13 de la inoculación en agar con dextrosa y papa (PDA). 140

Figura 6.34. Respuesta diferenciada de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* (CP-50: izquierda; CP-517: centro; CP-460: derecha), después de la confrontación con las cepas del “moho verde” de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112), al día 13 de la inoculación en agar con dextrosa y papa (PDA; pH 5.6).

140

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, se observa en la industria productora de hongos comestibles poca diversificación en cuanto a especies y variedades cultivadas comercialmente, además de que la mayor parte de las cepas utilizadas provienen del extranjero, principalmente de regiones templadas (Martínez-Carrera *et al.*, 1992). Este último factor, ha sido una de las razones que explican el fracaso de algunos productores, ya que las cepas que utilizan no se adaptan a las condiciones de la región, ni a las variaciones ambientales a lo largo del año. Asimismo, otros productores no pueden mantener una producción constante, y por lo tanto, los centros de investigación que apoyan el desarrollo tecnológico deben mantener programas de mejoramiento genético para suministrar cepas con potencial comercial. En nuestro país, prácticamente las especies preferidas por los cultivadores de *Pleurotus* y los consumidores son *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., mayoritariamente, y *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. en segundo término. Sin embargo, a pesar de la gran diversidad biológica presente en México, los esfuerzos científicos y tecnológicos por recuperar cepas silvestres de hongos comestibles con potencial de cultivo y comercialización son mínimos. Este germoplasma representa una enorme fuente de características genotípicas y fenotípicas que podrían contribuir a diversificar las especies de hongos comestibles en el mercado nacional e internacional (Martínez-Carrera *et al.*, 1993). Dicho material se adaptaría de mejor forma a las condiciones locales, y brindaría opciones al consumidor final.

Por otra parte, en México, el diagnóstico de las diferentes plantas productoras de hongos comestibles realizado por Ortega-Garrido (2002) permitió identificar a los principales agentes biológicos contaminantes, concluyendo que *Trichoderma* spp. fue el más peligroso. En el país, la problemática sobre el “moho verde” *Trichoderma* radica principalmente en que no existen cepas en el mercado que sean resistentes, a la falta de conocimiento o de aplicación oportuna de medidas de manejo, prevención, control y erradicación. Esto constituye una desventaja en el desarrollo del cultivo de los hongos comestibles, ya que pueden generarse serias disminuciones en los rendimientos, con las consecuentes pérdidas económicas. Por ello es necesario seleccionar cepas nativas de hongos comestibles que ofrezcan alternativas prometedoras. Además, es recomendable la rotación de variedades comerciales y de especies de *Pleurotus* para cortar las rutas de transmisión de las enfermedades.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Los hongos como recurso genético y su conservación

Los hongos constituyen un reino independiente en el sistema de clasificación biológica y comprenden un grupo extremadamente amplio que incluye levaduras, mohos y hongos macroscópicos. Se presume que la cantidad de especies que pertenecen a este reino es de un millón o más. Los hongos llaman la atención debido a sus diversas funciones, juegan un papel importante en el mantenimiento del ecosistema natural y participan en la conservación ambiental descomponiendo plantas y animales. Los hongos también forman relaciones simbióticas con las plantas, ayudándolas ejerciendo efectos promotores del crecimiento, incrementando su tolerancia contra el estrés ambiental, y purificando los contaminantes ambientales. Además, los hongos son ampliamente consumidos como alimento saludable debido a su excelente valor nutricional. Recientemente, las propiedades funcionales y medicinales de los hongos comestibles, representadas por sus efectos inmunoactivos, antioxidantes, anticancerígenos y anticoagulantes han atraído mucho interés. Así, los hongos representan recursos genéticos potenciales con funciones y propiedades benéficas aún sin descubrir, por lo cual debe estudiarse adecuadamente (Chang & Miles, 2004).

2.1.1 Concepto de recurso genético

El concepto de recurso no está definido per se, sino que depende en gran medida del nivel y amplitud cultural de los grupos humanos involucrados en su definición. El término recurso proviene del vocablo latino recursus (acción de acudir a una persona o cosa), se entiende que con el fin de obtener algún beneficio o satisfactor de tal acción (Cuevas, 1988).

Ecológicamente, “recurso” es un factor medioambiental que puede ser utilizado por un organismo, y por tanto es susceptible de competencia (Portilla & Zavala, 1990). El adjetivo genético hace alusión a la genética (del griego génesis), ciencia que estudia la herencia y las bases hereditarias de los organismos. Entonces un recurso genético es un factor relacionado con la transmisión de caracteres de una generación a la siguiente, al que un organismo, en este caso el ser humano, acude para obtener beneficios o satisfactores.

Así, los recursos genéticos comprenden la información genética codificada en el genoma (de los organismos del medio ambiente, el objeto al que se acude) que tiene un uso actual o

potencial (el beneficio o satisfactor) para la humanidad, los mecanismos biológicos para trasladar esta información en fenotipos, y la forma a nivel de organización biológica en que se perpetúa (Cuevas, 1988). Alternativamente, se puede considerar la definición general de “recursos genéticos” de la OCDE, la cual incluye todos aquellos materiales genéticos, con valor real o potencial, que contienen unidades funcionales hereditarias y que provienen de microorganismos, plantas, animales u otros. El término considera tanto a los materiales que ya han sido descubiertos, como aquellos materiales aún por descubrir (Sobal *et al.*, 2007a).

Zimmermann (1951) señaló que el conocimiento es en verdad el verdadero creador de todos los recursos, y que en buena parte estos son creaciones del hombre. Efectivamente, un elemento de la naturaleza puede estar ahí por muchos años sin llegar a constituir un recurso, hasta que el conocimiento de sus cualidades lo convierte en un recurso potencial o efectivo. Una vez que una parte de la naturaleza se ha convertido en un recurso, el ser humano trata de obtener el mayor provecho posible de los factores bióticos, y ha sometido a un proceso de domesticación muchos de ellos. Estos recursos muestran una gran variabilidad en cuanto a formas, tamaños y rendimientos. Así, las limitaciones y aleatoriedad del medio ecológico han obligado al hombre a realizar las mezclas de genotipos que le garanticen la menor inestabilidad posible (Cuevas, 1988).

2.1.2. Antecedentes históricos

Los humanos siempre han hecho uso de otras especies. Por los últimos 10,000 años, nuestro alimento ha provenido cada vez más de plantas y animales domesticados. Sin embargo, especialmente en el mundo en desarrollo, las especies silvestres aún proporcionan bienes y servicios esenciales que no están disponibles de ninguna otra fuente.

A través de toda la historia evolutiva, los humanos fueron la causa más probable de la extinción de muchas especies, aún cuando vivíamos como cazadores y recolectores a densidades poblacionales mucho menores que las actuales. Sin embargo, mientras que las extinciones han ocurrido siempre, la rapidez de pérdida de especies silvestres se ha acelerado dramáticamente en los últimos dos siglos. Esto es en gran parte debido a varios avances tecnológicos importantes en ese período. No hay duda de que los humanos están actualmente destruyendo la diversidad a un ritmo alarmante (Martínez-Carretero, 1992; Milner-Gulland & Mace, 1998). Algunas de las causas principales son las siguientes:

- Se están cambiando los hábitats de aquellos que son relativamente favorables para la biodiversidad (*e.g.*, los humedales) a los que no lo son (*e.g.*, los monocultivos agrícolas y los desarrollos urbanos).
- Las especies están siendo amenazadas directamente por los procesos de recolección que cada vez se vuelven tecnológicamente más avanzados.
- El crecimiento de la población humana está en la raíz de la amenaza para los recursos naturales. De hecho, está determinando un impacto cada vez mayor sobre los recursos naturales, ya sea para satisfacer necesidades básicas: alimentación, vivienda, educación (pulpa para papel), como para mejorar la calidad de vida: recreación, vías de comunicación, depósito de residuos, etc. El crecimiento de la población inevitablemente conduce a un incremento en la demanda de recursos, y un incremento indefinido en esa demanda no es compatible con la conservación de nuestra base de recursos. El siglo pasado ha visto una elevación particularmente dramática en la población humana. Pero la relación entre población y consumo no siempre es simple. Debe tenerse en cuenta que una sola especie, la humana, compite con el resto de las especies por recursos similares: suelo, agua, nutrientes, etc. Por ello resulta inevitable el conflicto entre intereses del hombre (producción agropecuaria rentable) y diversidad de las especies. Es decir, entre actividades agrícolas en general y la conservación. Los pastizales naturales y los bosques son quizás los ecosistemas más profundamente impactados para introducción de sus tierras al cultivo.
- Los avances tecnológicos están detrás del crecimiento de la población humana, así como del impacto que cada comunidad tiene sobre el ambiente. Actualmente, las poblaciones que más consumen son aquellas de los países ricos donde las familias tienden a ser pequeñas. Donde el crecimiento de la población es rápido, las familias están llevando típicamente vidas frugales. (Martínez-Carretero, 1992; Milner-Gulland & Mace, 1998).

2.1.3 Biodiversidad

El término biodiversidad fue usado por primera vez en un congreso científico en Washington D.C. (E.U.A.) en 1986 y desde entonces se ha adoptado cada vez más como una contracción de diversidad biológica. El intenso interés internacional surgido recientemente sobre el tema ha sido el resultado de la preocupación en cuanto a la conservación de los recursos genéticos, la destrucción de los bosques, extinción de especies y el efecto del calentamiento

global. Esta área de investigación ha tomado gran importancia y ha dado por resultado el surgimiento de una nueva disciplina: los estudios de la biodiversidad, con una subdisciplina de biología de la conservación.

La biodiversidad ha sido definida por ‘la convención sobre la diversidad biológica -1992’ como la variabilidad entre organismos vivos (plantas, animales y microorganismos) de todas las fuentes, incluyendo sistemas terrestres, marinos y otros sistemas acuáticos y complejos ecológicos de los cuales son parte. Esto incluye diversidad dentro de especies, entre especies, y de ecosistemas. Los tres niveles fueron llamados subsecuentemente como biodiversidad genética, de organismos y ecológica.

La biodiversidad es la variabilidad de la naturaleza a todos los niveles, desde los genes, pasando por los individuos y las especies hasta los ecosistemas, incluyendo procesos biológicos así como entidades. Más concretamente, la biodiversidad es la suma total de la variación biótica desde el nivel de genes hasta ecosistemas. La conservación biológica significa mantener la biodiversidad, lo que implica la prevención de la extinción de especies, pero es mucho más amplia que esto. La conservación es distinta de la preservación, ya que involucra el reconocimiento de la naturaleza dinámica de los sistemas biológicos, permitiéndoles que cambien y evolucionen. Cuando se considera a las especies como recursos, entonces la conservación frecuentemente tiene un significado ligeramente diferente; el énfasis usualmente se pone en el sostenimiento del recurso de modo que pueda continuar la explotación productiva (Milner-Gulland & Mace, 2000; Purvis & Hector, 2000, Kaul, 2002). Numerosas causas naturales o antropogénicas pueden conducir a una disminución de la diversidad en un grupo taxonómico particular, reduciendo a este grupo a unas cuantas especies. Otras veces la extinción puede abarcar grupos completos. El número de especies que actualmente está en peligro de desaparecer es muy elevado, presentando una mayor posibilidad aquellas que constituyen los últimos representantes de grupos anteriores, o por el contrario, especies relativamente recientes. En los conceptos actuales se considera amenazada o en peligro de extinción aquella especie (o grupo) con alta probabilidad de extinción en los próximos años o décadas. Cuando la extinción ocurre localmente, por ejemplo en un sector de un bosque, las especies pueden reintroducirse por invasión desde las áreas contiguas e iniciar la etapa de recuperación. Actualmente la mayor causa de pérdida de biodiversidad es la destrucción antropogénica de hábitats naturales (Martínez-Carretero, 1992).

El crecimiento poblacional y los cambios en el entorno requieren de la disponibilidad de diversidad genética para el desarrollo de sistemas de producción sostenibles, eficientes y competitivos. Esto implica coleccionar, conservar y conocer los atributos de las poblaciones en mantenimiento de especies de valor actual y taxones relacionados, al igual que entidades biológicas con potencial de desarrollo, lo cual cobra importancia dada la creciente erosión genética. Esta es la pérdida de variabilidad genética por pérdida de especies de relativo valor actual; por pérdida de especies silvestres parientes de las cultivadas cuyo potencial genético podría utilizarse para mejorar a estas últimas; y por desaparición dentro de una misma especie de subespecies, razas o variedades, con una composición genética distinta, y por ende, con exigencias ecológicas también distintas. Esto plantea la necesidad de estrategias complementarias de conservación *ex situ* e *in situ*, dando prioridad a la variabilidad genética a ser incluida en el proceso, debido a los costos de mantenimiento, y considerar factores no sólo económicos sino también sociales, así como las limitantes actuales para acceder a la diversidad internacional (Martínez-Carretero, 1992; Lobo & Medina, 2009).

Generalmente se piensa en la diversidad genética como la cantidad de variabilidad genética entre individuos de una variedad, población o especie. Comúnmente se considera que la vulnerabilidad genética resulta de una reducción en la variabilidad genética. Sin embargo, ahora está claro que la diversidad genética *per se* no proporciona ninguna seguridad contra la vulnerabilidad genética. La diversidad genética sola es una inadecuada defensa, a menos que la diversidad incluya resistencia genética al problema en cuestión. Lo que importa es la diversidad en los alelos que codifican para susceptibilidad o resistencia al agente que causa el problema. Esto no significa que no se deba incrementar la diversidad genética de las especies que dependemos, ni tampoco permitir que se pierdan los tipos primitivos, reemplazados por las variedades recientemente introducidas. Hasta donde sea posible, se deben conservar todas las fuentes de germoplasma para posible uso futuro en reproducción. Para incrementar la diversidad genética sólo se tienen que introducir nuevas fuentes de germoplasma que no estén estrechamente relacionadas con las que están en uso. Uno de los aspectos más importantes en el manejo de recursos de germoplasma, es el de la evaluación. El grueso de los recursos de germoplasma que ahora se encuentran en los bancos de genes de todo el mundo, no se utilizará hasta que se haya determinado su potencial valor como material de reproducción. Hasta que esto

se haya llevado a cabo, tiene poco sentido extender la presente actividad de recolecta más allá de la requerida para salvar materiales amenazados con la extinción (Brown, 1983).

2.1.4 Importancia de la conservación

Dentro de las comunidades, los derechos para explotar áreas o para cazar presas particulares estaban a veces limitados a linajes o a determinada edad dentro de la sociedad. Particularmente, los recursos apreciados a veces eran reservados para los líderes y élites, que no permitían que miembros menos poderosos de la sociedad los utilizaran. Algunas de las primeras reservas naturales fueron sitios sagrados, otras eran terrenos de caza que la gente poderosa establecía como áreas protegidas en las que podían practicar su deporte. Las reservas frecuentemente se han establecido como refugios de todo uso de consumo, y frecuentemente se mantienen en gran parte por razones recreativas o estéticas (Milner-Gulland & Mace, 2000).

La biodiversidad contribuye a la productividad, sostenibilidad y estabilidad de los sistemas agrícolas, independientemente de su nivel de complejidad. Por otro lado, hay preocupación mundial por su pérdida acelerada, y se ha predicho una extinción importante de especies hacia el año 2050 como secuela de los cambios en el clima y en el uso de la tierra. Lobo & Medina (2009) señalaron que en relación a la conservación, el reto clave para los científicos tiene tres facetas: 1) Estudiar y clasificar la diversidad biológica; 2) Detener la pérdida de los ecosistemas, especies y diversidad genética; y 3) Alimentar una población humana creciente. Por otra parte, los recursos genéticos constituyen la materia prima para el desarrollo de nuevas variedades por parte de los mejoradores, las cuales son indispensables para satisfacer las demandas de una población creciente y las impuestas por nuevas limitantes derivadas de la presión de las plagas, enfermedades y condiciones ambientales cambiantes.

2.1.5 Conservación de recursos genéticos de hongos

En comparación con la atención que se pone a la biodiversidad de animales y plantas, se ha desatendido la diversidad microbiana. Esto a pesar del hecho de que las plantas y los vertebrados constituyen solamente 3% y 0.5% de la biota de la tierra, respectivamente, mientras que la mayor proporción es de naturaleza microbiana. En el caso de los hongos esto es probablemente debido a que la parte activa, el micelio, no es fácil de observar. La falta de atención es sorprendente, considerando que el reino *Fungi* contiene aproximadamente 1.5

millones de especies, la mayoría aún sin describir, clasificándose en el segundo lugar sólo detrás de los insectos en el número de especies. Las especies de hongos representan aproximadamente 4% de las especies conocidas y 8% de las especies estimadas de toda la vida en la tierra. Además, de los 300,000 taxa descritos, hay cerca de 10,000 especies de macromicetos. De estas, alrededor de 2,000 especies (en más de 30 géneros) se consideran comestibles. Sólo 40 pueden cultivarse bajo condiciones controladas y alrededor de 20 se cultivan comercialmente. La micología y la conservación de la naturaleza se han desarrollado por separado por largo tiempo, ya que los micólogos no estaban conscientes de las posibles amenazas a la micobiota y los conservacionistas creían que eran innecesarias medidas especiales para este grupo. Sin embargo, en el pasado reciente, los micólogos especialmente de Europa Central y Occidental, han notado cambios alarmantes en la micobiota principalmente en los hongos más grandes. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Recursos Naturales (IUCN) confirmó la necesidad de la conservación fúngica estableciendo un comité sobre hongos para estimular actividades en todo el mundo en 1990. Los hongos no se pueden conservar sin un conocimiento de la variedad de especies y su distribución actual (Kaul, 2002; Labarère & Bois, 2002).

2.1.5.1 Los hongos y estudio de su diversidad

Los hongos desempeñan una función importante en el equilibrio ecológico de la naturaleza en muchos aspectos. Además, juegan un importante papel en nuestra vida diaria. Tienen valores medicinales como fuente de productos farmacéuticos y se usan en la industria de alimentos (*e.g.*, en la producción de pan, queso, yogur, cerveza, hongos comestibles, vitaminas, sabores, ácido acético). También tienen su lugar en el compostaje de materiales orgánicos de desecho y en la biorremediación de suelos contaminados por la industria. Uno de los grupos más evolucionados del reino *Fungi* es el de los *Basidiomycetes*, que por su papel ecológico se puede dividir en tres grupos: hongos saprófitos, simbióticos (micorrízicos) y parásitos. En la industria, tienen más interés las especies saprófitas. Los hongos saprófitos utilizan material orgánico muerto como fuente de nutrientes, como la madera, hojarasca o estiércol. Los *Basidiomycetes* micorrízicos, tales como *Laccaria bicolor*, son capaces de intercambiar nutrientes con sus simbiontes árboles y protegen las raíces de sus hospederos contra el ataque de otros microorganismos. Los hongos parásitos atacan a otros organismos como recurso nutritivo y pueden matar a su hospedero. Independientemente de su papel ecológico, muchos de los

Basidiomycetes superiores y algunos *Ascomycetes* son capaces de formar cuerpos fructíferos para la reproducción sexual. Muchos de estos cuerpos fructíferos son comestibles. Los carpóforos de los *Basidiomycetes* saprófitos se pueden producir en cultivo industrial. El hongo comestible *Pleurotus* spp., en su papel de reciclador de materia orgánica, juega un papel importante para el medio ambiente, la agricultura y la alimentación. Se considera como cultivo de ciclo corto capaz de transformar desechos en alimentos para humanos y para el ganado. Puede restaurar suelos contaminados y proteger el ambiente. Algunas especies de *Pleurotus* pueden ser usadas para el control biológico de patógenos. Algunos de sus productos metabólicos también son requeridos por las industrias química y farmacéutica. Por tanto, pueden ser utilizados para la producción de nuevos antibióticos, moléculas y compuestos útiles para mejorar la salud humana, y por su interés en la industria química (Herrera & Ulloa, 1990; Labarère & Bois, 2002; Rühl *et al.* 2007).

La recolección, caracterización y conservación de recursos genéticos han llegado a ser tema de importancia científica, biológica e industrial en todo el mundo, así como una estrategia fundamental para desarrollar las nuevas generaciones de cepas comerciales. Las poblaciones silvestres representan no solamente hongos para ser potencialmente cultivados, sino también una destacada fuente de productos biosintéticos y genes para ingeniería genética. La mayor parte de esfuerzos globales y regionales hasta ahora se han enfocado sobre los hongos comercialmente importantes, *Agaricus*, *Pleurotus*, y *Lentinula*. Latinoamérica es una región fundamental para la conservación de la biodiversidad del mundo. Seis países (Brasil, Colombia, Ecuador, México, Perú, Venezuela) de esta región están considerados como verdaderos lugares de megadiversidad. Sin embargo, es paradójico, que sólo haya unos cuantos programas para la recuperación, caracterización y conservación de germoplasma de hongos nativos, donde existe un notable desarrollo de la industria (Sobal *et al.*, 2007a).

El entendimiento de los patrones de diversidad genética de las especies es fundamental no sólo para abordar asuntos que conciernen a los procesos evolutivos y al desarrollo de estrategias de conservación, sino también como un prerrequisito para el uso eficiente de los recursos genéticos en programas de reproducción. El interés en la estructura genética de las poblaciones naturales se ha incrementado en los últimos años debido a la necesidad de ampliar el conocimiento de la variación genética en las especies cultivadas. Nuevas técnicas para el estudio de la variación genética de especies silvestres a variedades cultivadas, mediadas por información sobre marcadores moleculares, son vías prometedoras para explotar los recursos genéticos

silvestres. En el caso de los hongos, los programas de reproducción se pueden ver obstaculizados por la falta de datos sobre el grado de variación genética en las poblaciones naturales. En efecto, a pesar de la importancia económica de las especies en general o de los hongos en particular, poco se sabía acerca de su historia natural y biología evolutiva. Por ejemplo, las fuerzas evolutivas que dan forma a las poblaciones naturales y la variabilidad genética disponible. El incremento en el conocimiento de la diversidad y características de las especies contribuirá directa e indirectamente a la comprensión del valor económico de la diversidad biológica de la tierra. Asimismo, fortalecerá la iniciativa de preservar nuestros recursos biológicos existentes (Labarère & Bois, 2002; Urbanelli *et al.*, 2003).

2.2 Hongos comestibles y medicinales

Los hongos se han usado como alimento desde tiempo inmemorial. Los hongos pueden ser consumidos por sus propiedades organolépticas y/o valor nutricional. Las propiedades organolépticas se pueden juzgar por el color, textura, y sabor, pero la determinación del valor nutricional requiere trabajo científico. Los análisis de la composición proximal de los hongos comúnmente cultivados revelan (Tabla 2.1) que los hongos son ricos en proteína cruda y carbohidratos, moderados en fibra cruda y ceniza, y bajos en contenido de grasa. Los valores energéticos son bajos (Chang & Miles, 2004).

Los hongos son buena fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Potasio y fósforo son los dos elementos dominantes en la porción mineral (Tabla 2.2). Los hongos contienen una cantidad considerable de tiamina, riboflavina, niacina y provitamina D₂.

En 100 g de proteína cruda (calculada como 4.38 x nitrógeno total) hay 38-48 g de los 9 aminoácidos esenciales. De estos, la lisina es la más abundante, mientras que el triptófano y la metionina son bajos. El contenido de ácido nucleico está dentro del rango de otros hongos filamentosos y es mucho más bajo que aquel las bacterias de rápido crecimiento (Chang & Miles, 2004).

Tabla 2.1. Composición proximal de especies cultivadas de hongos comestibles (Chang & Miles, 2004).

Especie	Humedad	Proteína cruda (N x 4.38)	Grasa cruda	Carbohidratos		Fibra cruda	Ceniza	Valor energético
				Totales	Sin N			
<i>Agaricus bisporus</i>	78.3-90.5	23.9-34.8	1.7-8.0	51.3-62.5	44.0-53.5	8.0-10.4	7.7-12.0	328-368
<i>Agaricus campestris</i>	89.7	33.2	1.9	56.9	48.8	8.1	8.0	354
<i>Auricularia</i> sp.	89.1	4.2	8.3	82.8	63.0	19.8	4.7	351
<i>Boletus edulis</i>	87.3	29.7	3.1	59.7	51.7	8.0	7.5	362
<i>Flammulina velutipes</i>	89.2	17.6	1.9	73.1	69.4	3.7	7.4	378
<i>Lentinula edodes</i>	90.0-91.8	13.4-17.5	4.9-8.0	67.5-78.0	59.5-70.7	7.3-8.0	3.7-7.0	387-392
<i>Pleurotus eous</i>	92.2	25.0	1.1	59.2	-	12.0	9.1	261
<i>Pleurotus</i> “florida”	91.5	27.0	1.6	58.0	-	11.5	9.3	265
<i>Pleurotus ostreatus</i>	73.7-90.8	10.5-30.4	1.6-2.2	57.6-81.1	48.9-74.3	7.5-8.7	6.1-9.8	345-367
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	90.1	26.6	2.0	50.7	-	13.3	6.5	300
<i>Volvariella displasia</i>	90.4	28.5	2.6	57.4	40.0	17.4	11.5	304
<i>Volvariella volvacea</i>	89.1	25.9	2.4	-	45.3	9.3	8.8	276

Los hongos también se han usado en la medicina tradicional por siglos en el Oriente. Los hongos medicinales tienen una historia establecida de uso en las terapias orientales tradicionales. Históricamente, se usaban fracciones hidrosolubles (cocimientos y esencias) de hongos como medicina en el Lejano Oriente, donde se originó principalmente el conocimiento y práctica del uso de los hongos. Hongos, tales como *Ganoderma lucidum* (“Reishi”), *Lentinula edodes* (*Shiitake*), *Inonotus obliquus* (Chaga), y muchos otros se han colectado y usado por cientos de años en Corea, China, Japón, y el oriente de Rusia., pero su potencial como potenciadores de la salud e inductores del sistema inmune es reciente. En las últimas dos décadas ha habido un ascenso repentino en la utilización de los hongos como nutraceuticos y se ha investigado y autorizado completamente muchas especies comestibles para uso medicinal. Los extractos de hongos se han vendido cada vez más como suplementos dietéticos. El valor de mercado de los productos de suplementos dietéticos en todo el mundo es de alrededor de 5-6 mil millones de dólares por año.

Cada vez se usan más los metabolitos de hongos para tratar una amplia variedad de enfermedades, particularmente en tanto que se pueden añadir a la dieta y utilizarse oralmente, sin

tener que pasar por las pruebas de fase I/II/III como una medicina ordinaria, y se consideran como un procedimiento seguro y útil para el tratamiento de enfermedades (Lull *et al.*, 2005).

Tabla 2.2 Contenido de vitaminas y minerales de algunos hongos comestibles cultivados (Miles & Chang, 1997).

Especie	Tiamina	Rivoflavina	Niacina	Ácido ascórbico	Ca	P	K	Fe	Na
<i>Agaricus bisporus</i>	1.1-8.9	3.7-5.0	42.5-51.0	26.5-81.9	23-71	790-1425	2849-4762	0.2-19.0	106-156
<i>Flammulina velutipes</i>	6.1	5.2	106.5	46.3	19	278	2981	11.1	278
<i>Lentinula edodes</i>	7.8	4.9	54.9	0	98	476	Nd	8.5	8.5
<i>Pleurotus ostreatus</i>	4.8	4.7	108.7	0	33	1348	3793	15.2	837
<i>Volvariella volvacea</i>	0.3-1.2	1.6-3.3	47.6-91.9	20.2	35-347	978-1337	2005-6144	6.0	151-347

Los valores se expresan como mg/100 g de peso seco.

Las especies que se han analizado adecuadamente en cuanto a valor medicinal son: *Ganoderma lucidum* (“Reishi”), *Lentinula edodes* (“Shiitake”), *Grifola frondosa* (“Maitake”), *Agaricus blazei* (“Hime-matsutake”), *Cordyceps militaris* (“Hongo oruga”), *Pleurotus ostreatus* (“Hongo ostra”) y *Hericium erinaceous* (“Cabeza de mono”). Hay muchas más especies de hongos cultivadas y silvestres comestibles y no comestibles que se han analizado en cuanto a sus componentes nutritivos y nutracéuticos, pero en menor grado que los enlistados. Los compuestos activos encontrados en los hongos son polisacáridos, fibras dietéticas, oligosacáridos, triterpenoides, péptidos y proteínas, alcoholes y fenoles, y elementos minerales (tales como zinc, cobre, iodo, selenio, hierro), vitaminas, y aminoácidos. Se ha encontrado que algunos compuestos bioactivos estimulan el sistema inmune, tienen propiedades anticancerígenas, actúan como agentes anti-hipercolesterolémicos y hepato-protectores, muestran actividad antiviral, y reducen los efectos secundarios de la quimio y radio-terapia (Lull *et al.*, 2005; Lakhanpal & Rana, 2005; Imtiaj & Tae-Soo, 2007). En particular, *Pleurotus* presenta una actividad antitumoral en las fracciones polisacáridas de los cuerpos fructíferos de casi todas las especies. Estos polisacáridos pertenecen a los (1→3)-β-D-glucanos. Se ha encontrado que

diferentes glucanos de *Pleurotus* aumentan la actividad de las células asesinas naturales (*NK cells*) y las células asesinas activadas por linfocina. Además de modular el sistema inmune, *Pleurotus* tiene actividad hipoglucémica, efectos antitrombóticos, inhibe el crecimiento tumoral, reduce la inflamación y disminuye la presión sanguínea y la concentración plasmática de lípidos. Se ha demostrado que el consumo de *P. ostreatus*, el cual contiene varios tipos de estatinas, previene el incremento de colesterol y tiene actividad antioxidante (Labarère & Bois, 2002; Chang & Miles, 2004). Se cree que algunas especies tienen características afrodisiacas. Diversos productos comerciales de los hongos están disponibles en el mercado. Destacan entre estos el “Lentinan” de *Lentinula edodes*, “Reishi Plus” de *Ganoderma lucidum*, “Grifon” de *Grifola frondosa*, y “Didanosine” de *Cordyceps militaris*. Se ha encontrado que los nutraceuticos alivian el estrés y la presión, comunes en la sociedad moderna, estimulando las respuestas inmunes del organismo, tanto básicas como secundarias. Hay más de 5,000 especies de hongos registradas a nivel mundial, de las cuales alrededor de 2000 están identificadas como comestibles. Una gran cantidad de las especies están todavía por ser analizadas en cuanto a su potencial nutraceutico/medicinal (Lakhanpal & Rana, 2005).

En años recientes, los avances en la biología molecular, automatización, y ciencia de la computación han cambiado la dirección de la búsqueda de moléculas nuevas. Ya no es aleatoria. Se han diseñado pruebas sensibles, de modo de acción y específicas para determinados blancos, para buscar moléculas de bajo peso molecular que se puedan desarrollar como nuevos fármacos por la intervención en puntos críticos en las vías bioquímicas.

Hay evidencia de que los hongos, siendo sistemas simples pero eucarióticos multicelulares, tienen mecanismos bioquímicos similares a los encontrados en los mamíferos. Se ha sugerido que debido a que algunos tejidos de vertebrados, tales como las glándulas y el sistema inmune, se han desarrollado recientemente en términos evolutivos. Algunas de las moléculas a través de las cuales estas células se comunican (hormonas y neuropéptidos) pueden haber aparecido mucho más temprano en la evolución de organismos unicelulares o multicelulares simples, tales como las bacterias y los hongos. En efecto, hay evidencia de que algunos mecanismos de control bioquímico fúngicos se han conservado a través de la evolución en los eucariotes superiores (incluido el hombre), y las moléculas reguladoras involucradas pueden funcionar en los sistemas de los mamíferos interfiriendo con las interacciones receptor-ligando y la señalización intracelular. *Achyla bisexualis* Coker, por ejemplo, produce las

hormonas sexuales anteridiol y oogoniol que son estructuras esteroides directamente análogas a las hormonas sexuales encontradas en los mamíferos. Se sabe que los alcaloides del cornezuelo del centeno producidos por *Claviceps purpurea* (Fr.) Tulasne son activos en los receptores de las células de los mamíferos y actúan como agonistas o antagonistas de la dopamina. Estos compuestos ahora se usan clínicamente para el tratamiento de la hemorragia posparto y la migraña. Dicha evidencia proporciona creciente apoyo a la hipótesis de que los sistemas de reconocimiento receptor-ligando en los vertebrados pueden haber evolucionado a partir de sistemas similares en microorganismos y así, la selección de productos microbianos puede ser un enfoque fructífero hacia el descubrimiento de nuevos tratamientos para la medicina.

Muchos grupos de hongos, particularmente los hongos superiores, no han sido sistemáticamente investigados para buscar moléculas biológicamente activas. La síntesis de metabolitos secundarios a menudo está asociada con la diferenciación celular y los complejos ciclos de vida de muchos hongos indican un considerable grado de diferenciación. De modo que es muy probable que los hongos altamente diferenciados, tales como los *Basidiomycetes* produzcan una rica serie de metabolitos secundarios. Finalmente, los hongos son excesivamente diversos y abundantes, un hecho a menudo pasado por alto por los conservacionistas interesados en la biodiversidad global (Le Roith *et al.*, 1982; Fox, 1992).

2.3. El cultivo de hongos

Debido a que muchos recursos naturales son limitados, la sustentabilidad se convierte en un importante concepto en el mantenimiento de la población humana, la salud, y el ambiente. El cultivo de hongos es una utilización directa de su papel ecológico en la bioconversión de los desechos sólidos generados de la industria y la agricultura en biomasa comestible, que también podía ser considerada como un alimento funcional o como una fuente de fármacos y productos farmacéuticos. Para hacer del cultivo de hongos una industria ambientalmente amigable, se deben investigar y desarrollar la biología básica de los hongos y la tecnología de cultivo. Esto viene muy al caso para *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, y *Ganoderma lucidum*, que se consumen en comunidades asiáticas, pero ahora están ganando popularidad en todo el mundo. Además del método convencional, el mejoramiento de cepas también se puede explotar por la fusión de protoplastos y la transformación genética. La biodiversidad es la contribución clave a los recursos genéticos para que los programas de reproducción cumplan las diferentes demandas

del consumidor. La conservación de estos hongos se hace esencial y es urgente no sólo debido a la pérdida masiva de su hábitat como resultado de la actividad humana y la deforestación, sino también debido a la competencia introducida por un cultivar con el germoplasma silvestre. El substrato residual del cultivo de los hongos, un subproducto sólido voluminoso, puede explotarse como fertilizante del suelo o potencialmente como agente de bio-remediación (Chiu *et al.*, 2000).

2.3.1 El cultivo de *Pleurotus* spp.

El cultivo de *Pleurotus* spp. pertenece al siglo XX. Falk reportó por primera vez el cultivo de este hongo en troncos en Europa (Alemania) alrededor de 1917. A pesar de ser relativamente reciente, el cultivo ha tenido un desarrollo muy rápido. *Pleurotus* spp. ha destacado por una rápida aceptación en el mercado y un crecimiento igualmente rápido de la agroindustria relacionada. De tal manera que en la actualidad se cultiva en casi todas las latitudes del mundo. Actualmente, el cultivo de *Pleurotus* compite con *Lentinula edodes* el segundo lugar en la producción mundial de hongos comestibles, sólo después de *Agaricus bisporus*. La razón de este crecimiento es que las especies de *Pleurotus* tienen una calidad organoléptica excelente. Además, secretan una amplia variedad de enzimas que pueden degradar las tres categorías clave de polisacáridos que se encuentran en la biomasa de los residuos agrícolas y forestales: lignina, celulosa y hemicelulosa. Por lo tanto, crecen sobre una gran diversidad de substratos. También se pueden desarrollar en un amplio rango de temperaturas (algunas especies pueden crecer a temperaturas relativamente altas, lo que disminuye costos de producción en zonas cálidas). Son fáciles de cultivar, y para el establecimiento de naves para su cultivo se precisa de poco capital inicial. El hecho de que para la preparación del substrato no se requiera de un proceso de compostaje complejo y prolongado, ni de la aplicación de tierra de cobertura al final del crecimiento micelial, como lo demanda el champiñón, o que tampoco necesite una fase de madurez ni de inmersión en agua, como en el caso del *shiitake*, hacen que su cultivo sea tal vez el más sencillo de todos los macromicetos conocidos. Su caso merece una atención especial, más que cualquier otro de los géneros cultivados hasta ahora, debido a la diversidad de substratos sobre los que puede crecer, permite apreciar de manera directa el impacto benéfico de cultivar hongos para el aprovechamiento de desechos agropecuarios (Royse & Sánchez, 2002; Chang & Miles, 2004).

Su notable crecimiento se ha alcanzado por las siguientes características deseables:

- i. El género *Pleurotus* es cosmopolita con varias especies comestibles que crecen en materiales localmente disponibles;
- ii. Varias especies se pueden cultivar en diferentes rangos de temperatura, haciendo posible su cultivo en zonas templadas, tropicales, y subtropicales del mundo.
- iii. Es un hongo de “pudrición blanca” capaz de degradar tanto la lignina como la celulosa. Las especies de *Pleurotus* son agentes primarios de descomposición. Tienen la capacidad, por tanto, de degradar directamente materiales que llevan celulosa y lignina sin preparación química ni biológica (compostaje).
- iv. El crecimiento micelial de todas las especies cultivadas es estimulado por una alta concentración de CO₂. La concentración de CO₂ en el aire de hasta 28% estimuló el crecimiento de *P. ostreatus* y *P. “florida”*, mientras que el límite para *P. eryngii* fue de sólo 22%. La alta concentración de CO₂ en el sustrato es útil en su establecimiento, ya que otros organismos competidores no pueden tolerar concentraciones tan altas.
- v. Se dispone de técnicas de cultivo baratas y sencillas para cultivar muchas especies comestibles. Es adecuado para cultivar tanto a escala de casa de campo como a niveles industriales.
- vi. Se dispone de una tecnología sencilla para la conservación post-cosecha (Kaul, 2002).

2.3.2 El género *Pleurotus*

La ubicación taxonómica del género es la siguiente:

Superreino: *Eucaryota*

Reino: *Fungi*

División: *Eumycota*

Subdivisión: *Basidiomycotina*

Clase: *Holobasidiomycetes*

Subclase: *Hymenomycetidae*

Orden: *Agaricales*

Familia: *Tricholomataceae*

Género: *Pleurotus*

(Margulis & Schwartz, 1982; Herrera & Ulloa, 1990; Vylgalis *et al.*, 1996).

Pleurotus spp. está disperso por todos los bosques de maderas duras del mundo; crece de manera natural principalmente en las zonas templadas o en las épocas más frescas de las áreas subtropicales sobre árboles en descomposición, tales como el roble (encino), olmo, arce, tilo, álamo, acebo, y laburno. Se han reportado *Pleurotus* parásitos de varios árboles. Se sabe de algunas especies como *P. cornucopiae* (Paul: Pers.) Roll., *P. cystidiosus*, *P. ostreatus* y *P. tuberregium* (Fr.) Sing., atacan y consumen nemátodos a través de estructuras en forma de perillas con pedúnculo (Barron & Thorn, 1987; Chang & Miles, 2004). Los micelios de los hongos (fase vegetativa) son importantes en el ecosistema porque son capaces de biodegradar el substrato y por tanto utilizar los desechos de la producción agrícola. *P. ostreatus*, comúnmente conocido como “seta”, es un degradador primario de madera y residuos vegetales. Las especies de *Pleurotus* alcanzan un 24.2% de la producción mundial (Kalmis *et al.*, 2008). Los *Pleurotus* silvestres están distribuidos por todo el mundo, como se muestra en la **Tabla 2.3**. Se sabe que *P. pulmonarius* y *P. cystidiosus* están distribuidos en la región tropical y subtropical, mientras que *P. eryngii* se recolecta en Europa, África y la mayor parte de Asia, excepto Corea y Japón, donde el hongo se cultiva comercialmente. *P. ostreatus*, el hongo comercial más importante dentro del género, está extendido en áreas templadas. La especie es bastante adaptable a una variedad de climas y substratos (Kong, 2004).

El género *Pleurotus*, según Singer (1978), tenía un total de 39 especies distribuidas en 4 secciones. Aunque Kong (2004) mencionó que se tenían registradas aproximadamente 70 especies. La determinación de una especie es difícil debido a las similitudes morfológicas y posibles efectos ambientales. Por más de 25 años se han usado estudios de apareamiento para delinear especies en *Pleurotus*. Actualmente, se reconocen al menos 15 grupos de interesterilidad en *Pleurotus* (Tabla 2.3). Los 15 grupos tienen un sistema de apareamiento tetrapolar gobernado por alelos múltiples, equivalente al descrito para *P. ostreatus* (Vilgalys *et al.*, 1996; Kaul, 2002; Kong, 2004).

2.3.3 Especiación en *Pleurotus*

La especiación en los basidiomicetos y otros hongos se ve fuertemente influenciada por el control genético de dos importantes eventos en el ciclo de vida: el apareamiento y la fructificación. Los parámetros fundamentales de la especiación: variación, selección y aislamiento se ven influidos por ellos. El aislamiento genético gradual que precede a la

especiación se puede observar fácilmente en el género *Pleurotus*. Cepas de *P. ostreatus* que se originan de diversas partes del mundo y que crecen en diferentes substratos muestran un 100% de compatibilidad en los cruzamientos. Los dicariones híbridos resultantes son viables sin excepción y desarrollan cuerpos fructíferos fértiles. Por otra parte, la compatibilidad se reduce, cuando se intenta la hibridación entre las morfovariantes alopátricas de *P. abalonus* y *P. cystidiosus*. Lo mismo sucede con los tres ecotipos de *P. eryngii*. Hay barreras totales de reproducción entre las especies aceptadas de *Pleurotus* que a veces son morfológicamente indistinguibles. Los resultados de experimentos de cruces con *P. pulmonarius* y *P. ostreatus* van de acuerdo con la idea de que las barreras de reproducción genética se erigen temprano en la especiación de los hongos. Las mediciones del contenido relativo de ADN de los núcleos celulares indicaron la presencia de diferentes niveles de ploidía con diferente número de cromosomas en varias especies (Bresinsky *et al.*, 1987).

Tabla 2.3 Grupos de interesterilidad en *Pleurotus* y su distribución (Vilgalys *et al.*, 1996).

Grupo ¹	Especie ²	Norte América	Europa	Asia	América del Sur	África	Australasia
I	<i>P. ostreatus</i>	•	•	•			
II	<i>P. pulmonarius</i>	•	•	•			•
III	<i>P. populinus</i>	•					
IV	<i>P. cornucopiae</i>		•	•			
V	<i>P. djamor</i>	•	•	•	•	•	•
VI	<i>P. eryngii</i>		•	•			
VII	<i>P. cystidiosus</i>	•	•	•		•	•
VIII	<i>P. levis</i>	•					
IX	<i>P. drynus</i>	•	•				
X	<i>P. tuberregium</i>			•		•	•
XI	<i>P. "agaves"</i>	•					
XII	<i>P. "abieticola"</i>			•			
XIII	<i>P. "brazil"</i>				•		
XIV	<i>P. australis</i>						•
XV	<i>P. purpureo-olivaceus</i>					•	

¹Grupos de interesterilidad definidos con base en pruebas de compatibilidad de apareamiento; ²Los nombres de especies aquí dados son los más comúnmente asociados con cada grupo. Dependiendo de la región geográfica, a veces pueden ser aplicables otros nombres de taxones. Los datos de distribución se basan en reportes tanto publicados como no publicados, por tanto se deben considerar incompletos o que requieren verificación adicional

2.3.5 Morfología de los esporóforos

En general, las “setas” son blandas, tienen un olor característico y sabor delicioso. Presentan un sombrero o píleo liso y convexo, raramente redondo, casi siempre en forma de ostra o concha, o en las etapas más viejas es tipo embudo. Pueden presentar escamas hacia el centro o en la base, y los cuerpos fructíferos son por lo general cespitosos. El tamaño del píleo puede variar de 5 a 30 cm de diámetro. El hongo es generalmente más pequeño en madera y más grande en substratos de desecho de algodón y paja. Puede ser de varios colores, incluyendo el azul, blanco, crema a café, amarillo y rosa, negro violáceo, pardo, gris, según la especie. La intensidad del color se puede alterar de acuerdo a cambios en los factores ambientales, por ejemplo, la luz y la temperatura. En general, el color será más oscuro en condiciones de luz intensa y clima frío, o el color será más claro en luz débil y clima caliente. Sus laminillas son decurrentes, anastomosadas en la base, anchas, blancas, blanquecinas y a veces amarillas o grises. El estípite es corto, excéntrico o lateral, engrosado gradualmente hacia el lado del sombrero o píleo, algunas veces no se presenta, pero el estípite de los hongos asporógenos está cerca del centro del píleo. Generalmente, mide alrededor de 2 cm de largo, 1-2 cm de grosor, y es blanquecino y de contexto blanco. Sus esporas son de color lila o crema en masa, elipsoides, con un tamaño promedio de 9.5 x 3.5 μm (Chang & Miles, 2004).

2.3.6 Especies cultivadas de *Pleurotus*

En este género se han reportado un gran número de especies cultivadas. Algunas de estas especies son las siguientes: *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae*, *P. sajor-caju*, *P. salmoneo-stramineus*, *P. abalonus*, *P. flabellatus*, *P. citrinopileatus*, *P. sapidus*, *P. smithii*, *P. cystidiosus*.

Varias especies nuevas se están añadiendo a la lista, con el avance de la exploración en muchos países del mundo. Se ha reportado el cultivo artificial de *Pleurotus* spp. en varios materiales lignocelulósicos. Sin embargo, hay poca evidencia que muestre diferencias fundamentales en la fisiología de varias especies. Muchos investigadores son de la opinión de que los caracteres taxonómicos aplicados a estas especies no son confiables y se tiene que aplicar la hibridación para establecer su verdadero estatus. La sistemática del género resulta confusa. Existen dificultades para la identificación taxonómica de las especies de este género. Esto se debe fundamentalmente a la gran variación y la amplia distribución que presenta (Kaul, 2002; Murrieta *et al.*, 2005).

Eger *et al.* (1979) discutió el estatus taxonómico de muchas especies norteamericanas – *Pleurotus sapidus*, *P. salignus*, *P. pulmonarius*, *P. columbinus*, y es de la opinión de que *P. ostreatus* y *P. “florida”* pertenecen a la misma especie y *P. ostreatus* es el nombre apropiado ya que éste es el más antiguo. También se ha discutido el estatus de muchas especies de *Pleurotus* y su interrelación con *P. ostreatus*. Se ha sugerido la existencia del complejo de *Pleurotus ostreatus*, en el que se pueden integrar varias otras especies (Kaul, 2002).

Las dos principales especies en cultivo comercial en Europa y Norteamérica son *P. ostreatus* (que fructifica < 15°C) y *P. “florida”* (que fructifica de 15-25°C). Algunas de las otras especies en cultivo comercial en varias regiones del mundo son: *P. sajor-caju* (India), *P. cystidiosus* (Taiwán), *Pleurotus abalonus* (China). En el ámbito internacional, *P. djamor* (Fr.) Boedijn está reportado como un hongo comestible que puede ser cultivado y usado como alimento en la regiones tropicales (Kaul, 2002; Ancona, 2007).

2.3.7 Ciclo de vida

En el caso de *Pleurotus* spp. corresponde al de un *Basidiomycete* típico. Las esporas al germinar producen un micelio primario. El micelio es monocariótico y contiene núcleos genéticamente idénticos. El apareamiento tiene lugar entre dos núcleos monocarióticos compatibles a través de fusión hifal, dando por resultado la formación de un micelio fértil dicariótico. La división nuclear y la formación de septos en este micelio ocurren a través de las fíbulas. Bajo las condiciones ambientales apropiadas se producen los cuerpos fructíferos, que llevan al desarrollo de cuatro basidiosporas por basidio en el himenio (Kaul, 2002).

2.3.8 Patrones de sexualidad

Pleurotus ostreatus es una de las primeras especies del género cuya sexualidad se investigó. Como resultado, se estableció que *P. ostreatus* es una especie con sexualidad heterotálica bifactorial. En las formas bifactoriales, los genes tipo de apareamiento A y B, controlan las partes distintas pero coordinadas del ciclo sexual. En un apareamiento el tipo A controla la sincronización nuclear y la formación de fíbulas, mientras que el tipo B controla la migración nuclear y la fusión de fíbulas. Los tipos A y B no están ligados, sino que se segregan independientemente. De aquí, los tipos A y B progenitores se segregan y recombinan en la meiosis, para producir 4 combinaciones posibles de los tipos, en una relación de 1:1:1:1.

También se estableció el multialelismo para ambos tipos de incompatibilidad. Los datos obtenidos revelaron un número total de hasta 63 tipos A y 190 tipos B en una población mundial natural de esta especie. También se estableció la migración nuclear. Las observaciones citológicas revelaron meiosis en el basidio que lleva a la formación de 4 basidiosporas uninucleadas, la naturaleza monocariótica y dicariótica del micelio (Raper, 1978).

La sexualidad de *P. corticatus* es similar a la de *P. ostreatus*, con la excepción de que el dicarion así como el homocarion tienen un ciclo asexual. Se ha reportado el heterotalismo bifactorial en *P. sajor-caju*, *P. flabellatus* y *P. sapidus* (Raper, 1978; Kaul, 2002).

2.4 Enfermedades y plagas de los hongos comestibles

En varias etapas de la producción de hongos, tales como el compostaje, la siembra, el corrimiento micelial, y el desarrollo de los hongos mismos (cuerpos fructíferos), existen oportunidades para que otros organismos entren y crezcan en el substrato o en el micelio, o en el esporóforo en desarrollo, y estas situaciones consecuentemente causan enfermedades. Incluidos aquí están los virus, las bacterias, hongos, nemátodos e insectos. Así, el estudio de las enfermedades de los hongos ha llegado a ser un aspecto muy importante de la investigación, debido a que estas enfermedades pueden causar una disminución en el rendimiento y hasta la pérdida del cultivo con la subsiguiente pérdida de ingreso para los productores. Costos adicionales involucran las medidas necesarias para prevenir las enfermedades (Chang & Miles, 2004).

En cuanto a *Pleurotus* spp., aunque se puede proporcionar cierta protección durante el proceso de elaboración del substrato, su cultivo está expuesto como cualquier otro a las alteraciones que pueden ocasionar descensos en el rendimiento o bien depreciar la calidad del producto. Estas alteraciones pueden ser debidas tanto a factores bióticos como abióticos. Entre las causas bióticas se encuentran los insectos, por ejemplo, los ácaros que se alimentan del “moho verde” *Trichoderma*. Su presencia viene acompañada muchas veces por grandes poblaciones de ácaros rojos que pueden causar irritaciones a los recolectores, los hongos, las bacterias y los virus. Entre los factores abióticos se hallan la temperatura, la luz, la concentración de anhídrido carbónico en el aire, la humedad relativa, y la presencia de productos químicos tóxicos en el substrato o en la atmósfera del local de cultivo, afectando de manera adversa la cosecha final. Por esto es aconsejable reconocerlas en un estadio temprano con el fin de limitar la

extensión de los daños. Los cultivos de *Pleurotus* y *Agaricus* comparten la mayoría de plagas y enfermedades. Es decir, los dípteros, los ácaros, las bacterias, y gran parte de los hongos parásitos y competidores. Esta situación puede originar problemas adicionales en algunas regiones, en las que las explotaciones de champiñón y “setas” se encuentran entremezcladas. Por ello ante un fuerte ataque de cualquier patógeno en champiñón, los cultivos más próximos de *Pleurotus* spp. pueden verse afectados (Fletcher *et al.*, 1986; Gea, 2002).

Entre los problemas más comunes que afectan a *Pleurotus* están:

Bacterias. El problema bacteriano más común que encuentran los cultivadores es *Pseudomonas tolaasii*. Esta es la misma bacteria que causa la mancha bacteriana de *A. bisporus*. Los síntomas de la enfermedad incluyen reducción del rendimiento y decoloración y fragilidad de los basidiocarpos. Los hongos infectados tienen una reducida vida de almacén. Una humedad relativa constante y alta, insuficiente movimiento de aire, sobrecalentamiento del substrato (arriba de 35°C), excesivo contenido de humedad, y especialmente una superficie húmeda de los hongos pueden exacerbar la infección por *P. tolaasii*. Bajar el porcentaje de humedad relativa a 80-85% y rociar la superficie de las bolsas entre oleadas con solución de blanqueador al 0.2% puede ayudar a mantener el control.

Insectos. Los insectos que infestan tejidos de hongos causan las mayores pérdidas para los cultivadores, particularmente durante los meses de verano. Las plagas de insectos más importantes asociadas con *Pleurotus* incluyen *Cecidomyiidae* (*Mycophila speyeri*), *Scatopsidae*, *Sciaridae* (*Lycoriella solani*), y *Phoridae* (*Megaselia halterata*, *M. nigra*). Los primordios de *Pleurotus* son muy sensibles a los vapores químicos, de modo que es difícil usar plaguicidas para controlar los insectos. Se han observado grandes grupos de cuerpos fructíferos deformados, después de haber aplicado insecticidas durante la formación de primordios. El uso de varias trampas para moscas y el apego a estrictas prácticas de higiene, particularmente durante la siembra y el desarrollo micelial, ayudan a mantener a las poblaciones de moscas debajo de los umbrales económicos. En los Estados Unidos, la incorporación de *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* (Bti) al substrato al sembrar, ha mostrado excelente efectividad contra las moscas sciáridas.

Ácaros. Los ácaros no constituyen una plaga de importancia en el cultivo de las especies de *Pleurotus*, no obstante, el pigmeofórico *Bakerdania mesembrinae* (Canestrini) es importante por su papel como indicador de un proceso inadecuado de compostaje y por estar asociado a la

presencia de *Trichoderma* spp. en el sustrato. Esta estrecha relación entre el hongo y el ácaro se pone de manifiesto en que *Trichoderma* spp. es el alimento preferido de este ácaro, y en que *B. mesembrinae* posee unas estructuras portadoras de esporas (esporoteca) que facilitan el transporte y diseminación de *Trichoderma* spp.

Hongos. La presencia de micromicetos asociados con los cuerpos fructíferos de los hongos cultivados se observó probablemente tan pronto como la gente se interesó en su cultivo. Después de todo, los micromicetos son ubicuos y tienen requerimientos relativamente simples para su crecimiento. Los materiales fácilmente disponibles en la naturaleza proporcionan los requerimientos de carbono, nitrógeno y minerales de los micromicetos. La disponibilidad de agua y oxígeno no es un problema en la mayoría de los ambientes, y los micromicetos son famosos por su capacidad para producir esporas asexuales en grandes cantidades. De modo que, como las bacterias, los hongos están presentes para sacar ventaja de los mismos sustratos que están disponibles otros organismos. Algunos hongos también son capaces de usar el micelio y esporóforos del macromiceto para sus propias necesidades, a menudo en perjuicio del macromiceto, causando diversas enfermedades. Los microhongos que se presentan en el cultivo de hongos comestibles pueden ser:

- a) Micoparásitos. Afectan los esporóforos en dos formas: biotrófica que depende del hospedero para su nutrición, sin destruir las células del hospedero, le causa poco daño; y necrotrofica, en la cual el huésped muere.
- b) Hongos competidores. Crecen asociados en el sustrato preparado para el desarrollo de los hongos comestibles. Esta contaminación puede ser suficientemente seria como para evitar la producción de carpóforos (Gea, 2002; Royse, 2003; Chang & Miles, 2004).

La mayoría de los hongos encontrados en la producción de “setas” crecen y se desarrollan sobre el sustrato y muy raramente son parásitos. Los géneros más frecuentemente encontrados incluyen *Aspergillus*, *Botrytis*, *Coprinus*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Trichothecium*. Los sustratos que sólo se han pasteurizado son más susceptibles a la infestación que los sustratos que se han pasteurizado y acondicionado. La infestación fúngica puede ser más que un problema cuando los sustratos se suplementan con nutrientes ricos en nitrógeno, especialmente si los suplementos no son nutrientes comerciales de liberación prolongada. Los hongos infestantes también pueden ser más que un problema cuando las temperaturas del sustrato se elevan arriba de los 35°C. Temperaturas más altas del sustrato pueden dañar la

semilla micelial, reducir las velocidades de crecimiento micelial, y dejar al substrato vulnerable ante competidores, tales como *Coprinus* spp. y *Trichoderma* spp. (moho verde). Los hongos de los géneros *Cladobotryum* y *Verticillium*, que se sabe causan enfermedad en *A. bisporus*, raramente se encuentran en el cultivo de *Pleurotus* spp. Estos hongos, cuando se presentan en el cultivo de “setas”, pueden localizarse principalmente en residuos de estípites o basidiocarpos viejos (Royse, 2003).

2.4.1. Mohos verdes

Cualquier enfermedad causada por mohos de color verde en bolsas o camas puede llamarse “enfermedad de mohos verdes”. El color verde mostrado por estos hongos viene de sus esporas, no de las hifas, las hifas de estos hongos son normalmente hialinas. Se informa de más de 30 hongos como agentes causales de la enfermedad del “moho verde” (Cha, 2005). Varios hongos imperfectos se forman sobre los substratos con subcompostaje que aún tienen altos niveles de carbohidratos fácilmente disponibles. Esto es muy común en el compost que no ha sido adecuadamente pasteurizado. Frecuentemente se encuentran especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, y *Penicillium*. Los mohos suelen considerarse competidores por los nutrientes, o antagonistas, más que parásitos (Fletcher *et al.*, 1986; Chang & Miles, 2004). El “moho verde” causado por especies de *Trichoderma* fue una vez reconocido como indicador de deficiente calidad del compost y era de menor importancia en el cultivo comercial de *Agaricus bisporus*. Sin embargo, en los últimos años, este “moho verde” se ha vuelto una enfermedad bastante destructiva y que genera graves pérdidas económicas (Park *et al.*, 2005).

Los primeros estudios reportaron que *T. viride* era la especie común de *Trichoderma* que se encontraba como colonizador del compost y un subsiguiente inhibidor del crecimiento micelial de los champiñones. Normalmente su presencia estaba asociada con excesiva humedad e inadecuada pasteurización, lo que llevaba a la incompleta transformación de los materiales nutritivos requeridos para el crecimiento de los hongos comestibles. *T. viride* es un vigoroso colonizador de la materia orgánica especialmente si tiene un contenido elevado de hidratos de carbono. Por este motivo, se encuentra a veces en los cereales de la “semilla” de los hongos comestibles (Fletcher *et al.*, 1986).

Se ha citado a *T. koningii* como el organismo causal de un problema en las camas de *A. bisporus*. Aunque la enfermedad del “moho verde” se encuentra principalmente en los locales de

producción de hongos donde se usa un compost conformado por paja, estiércol, cascarilla de semilla de algodón, cascarilla de arroz, y aserrín, también puede aparecer en el cultivo de otras especies de hongos con diferentes substratos (Chang & Miles, 2004).

2.4.1.1 Descripción de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue introducido por Persoon en 1794 para cuatro hongos microscópicamente similares, que fueron descritos como de apariencia pulverulenta, con una cobertura pilosa. Las especies de *Trichoderma* son hongos que aparecen en cualquier tipo de suelo y que producen colonias blancas, amarillas o (más típicamente) verdes cuando se cultivan.

Las cuatro especies originalmente descritas en *Trichoderma*, fueron a saber, *T. aureum*, *T. nigrescens*, *T. roseum*, y *T. viride*, cada una con diferente color de conidios. Ahora se sabe que no están emparentadas entre sí. Las especies verdes de *Trichoderma* fueron inicialmente clasificadas como una sola especie, *T. viride*, hasta que fueron subdivididas por Rifai (1969). Sin embargo, el nombre de *T. viride* todavía es ocasionalmente utilizado indiscriminadamente para describir especies verdes de este género (Rifai, 1969; Bissett, 1991; Wainwright, 1995). Los aislamientos de *Trichoderma* a menudo se pueden reconocer por caracteres macroscópicos, que incluyen rápido crecimiento en cultivo, un escaso micelio aéreo, y producción de característicos conidióforos blancos o verdes. Los teleomorfos conocidos para *Trichoderma* son *Hypocrea* (Fr. : Fr.) Fr., y posiblemente también *Podostroma* Karsten, y géneros estrechamente relacionados de *Hypocreaceae*. Muchas especies de *Hypocrea* producen un “típico” anamorfo *Trichoderma* en cultivo. No se conocen teleomorfos para la mayoría de aislamientos de *Trichoderma* que habitan el suelo y la madera, y posiblemente no existan teleomorfos para muchas especies comunes de *Trichoderma* (Rifai, 1969; Bissett, 1991).

Las especies del género *Hypocrea* forman sus peritecios inmersos en estromas, en cuya superficie se notan los ostiolos. Las ascas son cilíndricas, angostas y cada una contiene una hilera o serie de ascosporas bicelulares, con una notoria constricción en el septo. Con frecuencia, en la madurez se separan las dos células de cada ascospora y constituyen lo que se denomina esporas fragmentarias, por lo que las ascas parecen tener 16 ascosporas. La mayoría de las especies de *Hypocrea* viven sobre hojas y troncos de diversas plantas, en la tierra y en cuerpos fructíferos de basidiomicetos y producen conidios con fiálides pertenecientes al género *Trichoderma* (Herrera & Ulloa, 1990).

Las especies de *Trichoderma* se utilizan para producir celulasas. Sin embargo, son particularmente efectivas como antagonistas del crecimiento de otros hongos, muchos de ellos patógenos de plantas, con el resultado de que las especies de *Trichoderma* son importantes agentes en biocontrol (Wainwright, 1995).

Este género fue monografiado por Rifai (1969), y las cepas de *Trichoderma* fueron asignadas a nueve agregados de especies diferenciados principalmente por los patrones de ramificación del conidióforo y la morfología del conidio. Reconoció que una variación importante quedaba por definirse en cada uno de estos nueve taxa agregados y consideró su revisión como una investigación preliminar de la variación en el género (Bissett, 1984).

En el género *Trichoderma* hay 32 ó más especies. Aunque actualmente se reconocen aproximadamente 35 especies con base en caracteres morfológicos y moleculares. Además del papel de unas cuantas de estas especies en la biotecnología, varias parecen ser importantes en los ecosistemas del suelo (Rinker & Betterley, 1994; Kullnig *et al.*, 2000). Las especies de *Trichoderma* son contaminantes comunes de la “semilla” de los hongos comestibles, compost y madera en las instalaciones comerciales del cultivo. La mayoría de las especies se consideran indicadores de calidad del compost o prácticas hortícolas (Castle *et al.*, 1998).

2.4.1.1.1 Clasificación de *Trichoderma*

Rifai (1969) proporcionó la delineación genética de *Trichoderma*, con base en caracteres microscópicos, la cual en general se acepta actualmente. Este género se caracteriza por colonias de rápido crecimiento que tienen conidióforos cespitosos, repetidamente ramificados, generalmente de forma dendrítica y regular; es decir, ramificada en un número indefinido de niveles, donde las ramas primarias producen ramas secundarias más pequeñas que también se pueden ramificar y así sucesivamente. Las ramas que se forman primero son largas, mientras que las ramas sucesivas apical y distalmente son progresivamente más cortas. Las ramas y fiálides a todos los niveles divergentes, tienen fiálides ampuliformes a lageniformes, generalmente estrechas en la base, más o menos anchas a la mitad y delgadas hacia el ápice, con cuello subcilíndrico corto y conidios hialinos o verdes (Bissett, 1984; Bissett, 1991; Wainwright, 1995).

Los conidióforos ramificados de *Trichoderma* se observan sólo en las áreas conidiales cespitosas. Los conidióforos pueden ramificarse. La degeneración de las características diagnósticas hace más difícil la identificación de las cepas de *Trichoderma* cuando las

observaciones son hacen en las áreas alejadas de la conidiogénesis. Una aparente falta de observaciones reproducibles en *Trichoderma* puede atribuirse a la variación de la conidiogénesis en los cultivos después de varias transferencias masivas. Esta tendencia puede superarse mediante la transferencia monospórica y cuidadoso mantenimiento del cultivo (Bissett, 1984).

La ubicación taxonómica general de *Trichoderma* es la siguiente:

Superreino: *Eucaryota*

Reino: *Fungi*

División: *Eumycota*

Subdivisión: *Deuteromycotina*

Clase: *Hyphomycetes*

Orden: *Moniliales*

Familia: *Moniliaceae*

Género: *Trichoderma*

(Margulis & Schwartz,1982; Herrera & Ulloa, 1990).

2.4.1.1.3 Desarrollo de cepas patógenas de *Trichoderma aggressivum*

En el pasado, la enfermedad del “moho verde” ocurría sólo periódicamente, generalmente en plantas que utilizaban compost de baja calidad o empleaban procedimientos inadecuados de saneamiento. Así, el “moho verde” no era serio problema cuando los productores tenían buena higiene y una adecuada preparación y pasteurización del compost (Chang & Miles, 2004). A mediados de los 1980s ocurrieron grandes pérdidas de cosechas atribuidas a la especie inicialmente identificada como *Trichoderma harzianum* en las Islas Británicas. El compost o cobertura de hongos infectada con una cepa agresiva de *T. harzianum* no producía hongos, y la pérdida de la cosecha era proporcional al área infectada (Castle *et al.*, 1998). Específicamente, en 1985, ocurrieron brotes más severos del “moho verde” *Trichoderma* en Irlanda, principalmente en compost embolsado. La enfermedad también se encontró en Inglaterra y Escocia con reducciones de rendimiento de hasta 30%. En Canadá y los Estados Unidos ocurrieron brotes igualmente serios de “moho verde”, y en 1994-1995 tuvieron lugar epidemias del “moho verde” *Trichoderma* con pérdidas de cosecha en Pensilvania que excedían los 20 millones de dólares durante un periodo de 3 años. Desde entonces, *Trichoderma* ha causado severos problemas en muchas áreas de Norteamérica. Esta infección ha llegado a ser conocida como la enfermedad del “moho verde”. No se han calculado con exactitud las pérdidas sufridas por los productores de Norteamérica, pero se ha estimado que son del orden de decenas de millones de dólares. La enfermedad del “moho verde” *Trichoderma* ha llegado a ser un problema importante en la

industria de hongos y el esfuerzo inicial se dirigió a estudios del organismo causal y a las medidas de control (Castle *et al.*, 1998; Chang y Miles, 2004).

La separación e identificación de la especie es un procedimiento difícil y toma tiempo. La especie que como ya se mencionó ha afectado significativamente el cultivo de hongos fue identificada en esos momentos como *T. harzianum*. Las poblaciones naturales se encuentran en todas partes, por ejemplo, en suelos agrícolas y forestales, ciénagas, colas de gatos, semillas, restos orgánicos, papel, corteza de madera o aserrín. En Irlanda del Norte se dividió originalmente a la especie en cuando menos 4 biotipos, conocidos como Th1, Th2, Th3 y Th4. Th1 no significa un problema serio, y al parecer el Th3 tampoco. Sin embargo, los biotipos Th2 y Th4 son particularmente agresivos en el cultivo de hongos comestibles. Otras especies de *Trichoderma* pueden causar enfermedades localizadas (*T. koningii*, *T. viride*, *T. pseudokoningii*). Otros mohos también son verdes y no se deben confundir con el “moho verde” *Trichoderma*. Estos incluyen especies de *Gliocladium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Chaetomium* (Rinker, 1994).

La gran mayoría de brotes de las epidemias de “moho verde” que afectaron a *Agaricus bisporus* en las Islas Británicas han sido causados por lo que parece ser una única cepa identificada en ese entonces como un posible mutante de *T. harzianum* Rifai, designado el biotipo Th2. Este hongo está particularmente bien adaptado a colonizar el compost de hongos sembrado y crece junto al micelio del hongo comestible. Debido a que *Trichoderma* también tiene micelio blanco, el desarrollo de la “semilla” de los hongos comestibles parece normal hasta después de poner la cobertura. Sin embargo, repentinamente comienzan a producirse grandes masas de esporas de color verde. La esporulación a menudo coincide con el aumento de iluminación del recinto (Mumpuni *et al.*, 1998; Seaby, 1989). Los biotipos Th1 y Th3 normalmente son excluidas durante la pasteurización del compost. El cuarto biotipo de *T. harzianum*, Th4, que es similar pero genéticamente distinto del biotipo Th2 causó seria infestación del compost en Norteamérica.

De los tres biotipos de *T. harzianum* encontrados en las Islas Británicas, el biotipo Th2, aunque raramente aislado de materiales crudos del compost, una vez introducido, coloniza el compost eficazmente. Durante varias epidemias del “moho verde” donde no se producían cuerpos fructíferos, *T. harzianum* Th2 predominó en el compost afectado. En contraste, los biotipos Th1 y Th3 que se encuentran comúnmente en materiales crudos de compost, pero infrecuentemente se encuentran en compost pasteurizado o colonizado, rara vez causan

problemas durante la producción de hongos. Si se introducen, los biotipos Th1 y Th3 colonizarán un área restringida de la compost que no afecta significativamente a *A. bisporus*. La relativa capacidad de los tres biotipos de *T. harzianum* para colonizar el compost en competencia con *A. bisporus* y su influencia sobre su crecimiento pueden asociarse con la producción de metabolitos secundarios (Mumpuni *et al.*, 1998).

Es importante poder identificar la cepa de *Trichoderma* que ha causado un brote de la enfermedad, ya que la cepa a menudo indica la fuente de infección. La **Tabla 2.5** muestra algunas de las principales características de los biotipos de *Trichoderma harzianum*. Cuando se encuentra el biotipo Th2, la experiencia en más de 10 plantas grandes indica que se requieren precauciones de higiene particularmente estrictas a fin de detenerla.

Tabla 2.5. Principales características diferenciales entre los biotipos de *Trichoderma harzianum* a los 4 días de cultivo en agar malta (Seaby, 1989)

Especie	Fiálides	Conidios	Color y borde de la colonia	Esporulación	Olor	Crecimiento (mm/h a 27°C)
(Th1)	Cortas y cerradas	Lisos, esféricos	Lisa, verde oscuro	Rápida y abundante	Malta	1
(Th2)	Cortas y cerradas	Lisos, ovoides	Lisa, blanca y después verde	Lenta, formando masas	Malta	0.9-1.1
(Th3)	Cortas y cerradas	Lisos, ovoides	Ondulado, verde jade	Radial, formando masas compactas	Coco	0.5-1
(Th4)	Cortas y cerradas	Lisos, esféricos	Ondulado amarillo verdosa	Escasa, formando masas compactas	Coco agrio	>0.5

Muchas especies de *Trichoderma* de esporas verdes son de apariencia muy similar y existe alguna confusión en la literatura respecto a su identificación. Esto último se hace difícil ya que se reconoce que la mayoría de las descripciones de especies cubren grupos con estados imperfectos o asexuales de *Trichoderma* muy similares, pero que se sabe que son diferentes especies debido a que tienen estados perfectos o sexuales de *Ascomycetes* diferentes. Desafortunadamente, es difícil, como ayuda para la identificación, hacer que el estado imperfecto produzca el estado perfecto en el laboratorio. El método de cultivar *in vitro* los

aislamientos afecta la apariencia de la colonia y hasta las proporciones de diferentes tipos de estructuras que esporulan (Seaby, 1989).

2.4.1.1.4 Transmisión de la infección

Individualmente, las esporas verdes son microscópicas. Pueden infectar el compost de los hongos comestibles más fácilmente justo después de sembrar. Se transmiten al compost fresco por el viento, adheridas a las partículas de polvo de compost contaminado, o por ácaros que se han alimentado del micelio de *Trichoderma* en compost infectado, en las manos y ropa de los trabajadores, y por la maquinaria. Las esporas y los ácaros que las llevan se producen en muy grandes cantidades y consecuentemente pueden llegar a casi cualquier parte de la planta de hongos. Esto implica que son posibles una amplia variedad de rutas de infección y casi cualquiera o cualquier cosa que tenga contacto directo o aún indirecto con el compost recién inoculado o en incubación es un portador potencial (Seaby, 1989).

2.4.1.1.5 Identificación molecular del “moho verde”

Las tecnologías moleculares han sido muy importantes en la obtención de conocimiento acerca de la enfermedad del “moho verde”. En particular se han usado para distinguir las formas agresivas de las no agresivas de *Trichoderma* que son morfológicamente similares, así como para determinar el tipo predominante de “moho verde” en las plantas comerciales de hongos comestibles. De estos estudios moleculares ha resultado una prueba clínica para la rápida determinación de los biotipos agresivos de *T. harzianum* (Th2 en Europa y Th4 en Norteamérica). Se han usado exitosamente el análisis por RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) para separar varias cepas aisladas en grupos.

Debido a que las características morfológicas pueden variar grandemente de un aislamiento a otro, y debido a que estas características están sujetas a cambios ambientalmente inducidos, la identificación de especies de *Trichoderma* y sus relaciones, se estudian ahora por técnicas moleculares y análisis computarizado. Por ejemplo, con el “moho verde” que se presenta en diferentes continentes, ha sido posible conocer las relaciones de los diversos tipos que se han aislado, así como el origen de los biotipos.

El grado de similitud de las secuencias de ADN de las cepas correlaciona con su parentesco. Los organismos que están distantemente emparentados tienen similitud solamente en

ciertas regiones del ADN que no pueden cambiar sin tener un impacto perjudicial o al menos significativo en la función. Los organismos estrechamente emparentados muestran diferencias en regiones donde la variabilidad no produce efectos importantes. Los resultados en el estudio de aislamientos causantes del “moho verde”, cuando se compararon las secuencias de seis aislamientos con otras secuencias de bancos de datos, indicaron que hay dos grupos distintos:

- Grupo I: contenía el biotipo Th1 y los biotipos agresivos Th2 (europeo) y Th4 (Norteamericano).
- Grupo II: contenía el biotipo Th3.

El árbol filogenético obtenido usando los datos moleculares indicó que Th1 es el ancestro más reciente para los tipos agresivos Th2 y Th4 (Chang y Miles, 2004).

Las formas que en la literatura se han reportado como *T. harzianum*, biotipos Th2 y Th4, que corresponden a la nueva especie y sus variedades recientemente identificadas: *Trichoderma aggressivum* sp. nov., *T. aggressivum* f. *aggressivum* (antes biotipo Th4) y *T. aggressivum* f. *europaeum* (antes biotipo Th2) causan la epidemia del “moho verde” en *Agaricus bisporus* cultivado comercialmente en Norteamérica y Europa, respectivamente (Samuels *et al.*, 2002). Están marcadamente separadas de su pariente más cercano, *T. harzianum*, en secuencias de la región ITS-1 del ADNr y un fragmento de aproximadamente 689 bp del gen del factor de elongación de traducción que codifica proteína (EF-1 α). Se distinguen de los morfológicamente similares *T. harzianum* y *T. atroviride* (este último también conocido como biotipo Th3) más fácilmente por la velocidad de crecimiento. De estos, sólo *T. harzianum* crece bien y esporula a 35°C, mientras que *T. atroviride* es el de más lento crecimiento. *T. aggressivum* f. *aggressivum* y f. *europaeum* son efectivamente indistinguibles morfológicamente aunque tienen velocidades de crecimiento sutilmente diferentes a 25°C en SNA y diferencias micromorfológicas estadísticamente significativas (Samuels *et al.*, 2002).

Cuatro “biotipos” genéticamente distintos, todos inicialmente identificados como *T. harzianum* Rifai se han asociado con la enfermedad del “moho verde” producida por *T. aggressivum*. Sin embargo, de estos sólo los designados originalmente como Th2 de Europa, y Th4 de Norteamérica, se asocian con una pérdida económica apreciable en las plantas de hongos comestibles. Ahora el biotipo Th1 es reconocido como *T. harzianum* s. str. ya que incluye la cepa ex-neotipo de *T. harzianum*. También incluye cepas de control biológico, ninguna de las cuales causa pérdidas en la producción de hongos a pesar de su presencia en las plantas

productoras. El biotipo Th3 ha sido reidentificado como el saprobio común *T. atroviride* P. Karst. (Samuels *et al.*, 2002).

2.4.1.1.6 Interacción hongos comestibles-*Trichoderma*

T. aggressivum es un potente antagonista de los hongos comestibles, ya que está adaptado a crecer en el compost de *Agaricus* resistiendo los efectos inhibidores de las bacterias presentes. No se han observado reacciones evidentes de defensa de cultivares de *A. bisporus* al ataque de *T. aggressivum*. La producción de hifas emergentes, la reacción en la zona de entrecruzamiento y la producción de lacasas son respuestas que se han descrito al confrontar *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* y *P. ostreatus* con *T. aggressivum* o con sus metabolitos extracelulares. Estas reacciones también se ven durante el cultivo de *L. edodes* en substratos lignocelulósicos, aunque su capacidad competitiva mejoró modificando la composición de los mismos, lo cual redujo la incidencia de *Trichoderma* spp. Una de las modificaciones fue la adición de componentes ricos en lignina y fenoles, los cuales podían actuar como inductores de lacasas y del sistema de defensa total (Savoie & Mata, 2003). Se ha reportado que la producción de lacasas es inducida por metabolitos extracelulares de *Trichoderma*. Sin embargo, no se cuenta con suficientes estudios sobre el género *Pleurotus* y su producción enzimática en condiciones de confrontación con algún antagonista (Murrieta *et al.*, 2002). Si se considera que la pigmentación del medio se debe mayoritariamente a la presencia de quinonas y otras sustancias producidas durante la acción oxidativa de las lacasas, entonces esta característica de los micelios podría ser utilizada como un factor de selección de cepas *in vitro* (Salmones & Mata, 2007).

2.4.1.1.7 Control de *Trichoderma*

Una vez que el “moho verde” se ha hecho evidente, es desafortunadamente muy tarde para evitar pérdidas considerables de rendimiento en los cultivos comerciales. Sin embargo, algunas de las medidas que pueden establecerse son las siguientes:

- Debe prestarse especial atención a la higiene del local donde se producen los hongos. Con deficientes condiciones de higiene, un pequeño brote del “moho verde” rápidamente se puede salir de control, debido al gran número de esporas que producen, por lo que son ya difíciles de contener.
- Pueden aplicarse tratamientos puntuales de sal a las áreas afectadas.

- El pre-tratamiento de la “semilla” de los hongos comestibles con algún fungicida es más efectivo que el tratamiento directo del compost (Fletcher *et al.*, 1986; Chang & Miles, 2004).
- Si el grano de la “semilla” se protege con fungicida, evitando así la colonización del compost por *T. aggressivum*, el micelio del hongo comestible crecerá vigoroso desde el grano de la “semilla” hacia la compost. Desafortunadamente, puede haber un efecto secundario adverso en que tanto *Verticillium* como *Dactylium* han mostrado resistencia a los fungicidas de benzimidazol, y en el largo plazo se generaría mayor resistencia genética. Por ello, debe tenerse cuidado en el uso de fungicidas.
- El control por la aplicación de fungicidas, tales como el benomyl, durante la *preparación* del substrato es generalmente eficaz para inhibir hongos competidores. Estos competidores son un problema mayor a temperaturas arriba de 35°C (Chang & Miles, 2004). Es necesario tener en cuenta que el uso de productos químicos durante el ciclo de cultivo está limitado por la elevada susceptibilidad de las especies de *Pleurotus* cultivadas a los plaguicidas y desinfectantes en general, y por el riesgo de acumulación de residuos de estos productos en los cuerpos fructíferos.

En general, las medidas que mejor pueden ayudar a reducir la contaminación por el “moho verde”, son la limpieza y la desinfección de los locales de cultivo vacíos, la eliminación cuidadosa de los substratos residuales y de todas las posibles fuentes de contaminación (restos de cosecha, residuos orgánicos), una adecuada pasteurización, y el buen manejo del cultivo por parte del personal encargado (Gea, 2002).

2.4.2 Control y selectividad

El control y el mejoramiento de los cultivos de hongos comestibles han provocado un considerable interés en los últimos años, ya que la producción de hongos es económicamente importante. El crecimiento micelial de *Pleurotus* spp. es rápido, y se pueden usar varios productos lignocelulósicos como substrato de cultivo. El objetivo de su preparación comercial es producir un substrato que sea óptimo y selectivo para el crecimiento micelial. En el caso de *Pleurotus* spp., esto se logra por la aplicación de varios tratamientos térmicos para eliminar los hongos competidores (Chang & Miles, 2004).

La preocupación por evitar la aparición de *Trichoderma* spp. también se refleja en los métodos empleados para la elaboración de los substratos de *Pleurotus* spp., de tal forma que se puede optar entre métodos con fundamentos distintos. Por ejemplo:

- Proporcionar una buena selectividad biológica, bien favoreciendo el desarrollo de bacterias termófilas, o bien mediante la adición al proceso de fermentación aerobia de activadores preseleccionados, como pueden ser *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* y *B. macerans*.
- Intentar la generación de selectividad contra las especies de *Trichoderma* mediante el ajuste del pH del substrato a valores de 7.5 o superiores, utilizando para ello caliza o procesos de fermentación cortos.
- La utilización de fungicidas para proteger el substrato de hongos competidores.

En definitiva, ninguno de estos métodos resuelve enteramente el problema, aunque si pueden ofrecer cierta protección (Gea, 2002).

Se han reportado experimentos que permiten incrementar el rendimiento al remojar la paja por períodos de 60 h, lo cual implica un lixiviado de la mayoría de los componentes solubles, azúcares entre ellos, así como una mayor presencia y desarrollo de mohos en los substratos no lixivados. Por otro lado, los tratamientos térmicos tienen una influencia decisiva sobre la selectividad del substrato. La pasteurización a 75°C y 85°C durante 24 h permite el crecimiento tanto de hongos contaminantes como de *Pleurotus*, sólo el tratamiento a 65°C producía un substrato que eliminaba casi todos los mohos contaminantes y permitía el crecimiento de *Pleurotus*. Durante la fermentación a 65°C se ha observado un rápido desarrollo de bacterias termófilas, las cuales son capaces de desplazar a los mohos contaminantes sin afectar significativamente el micelio de *Pleurotus*. En estos casos, la pasteurización de la paja a altas temperaturas y a 65°C provoca una liberación de azúcares, por ejemplo, glucosa, la cual después de 24 h es completamente metabolizada como fuente de carbono por bacterias termófilas. Por ello, el empobrecimiento de azúcares y la alcalinización de la paja durante el proceso de fermentación son factores críticos para la producción de substratos selectivos (Castañeda & Leal, 2007), ya que las fuentes de carbono de fácil asimilación, principalmente azúcares solubles como la glucosa, constituyen el elemento que inicia y dispara el desarrollo de mohos contaminantes y antagonistas. Es por ello que se recomienda emplear procedimientos que produzcan substratos con bajos niveles de azúcares reductores para lograr mayor selectividad en el substrato, es decir,

substratos en los que el micelio de *Pleurotus* pueda desarrollarse más rápidamente que aquel de mohos contaminantes y antagonistas (Castañeda & Leal, 2007).

2.5 Nutrición de los hongos

Los hongos están considerados generalmente como heterótrofos estrictos. Son incapaces de fotosintetizar y por consiguiente necesitan substratos ricos en energía para alcanzar sus requerimientos básicos de crecimiento. Los hongos producen una amplia variedad de enzimas extracelulares, principalmente oxidasas e hidrolasas y pueden utilizar la mayor parte de los substratos orgánicos que existen naturalmente, incluyendo la celulosa, la quitina, el almidón, azúcares, hemicelulosas y lignina. Normalmente, los carbohidratos son las principales fuentes de carbono accesibles a los hongos, ya que son metabolizados para proporcionar energía y también actúan como precursores para la síntesis de material celular.

Los hongos utilizan nitrógeno, fundamentalmente en la forma de amonio, aunque casi todos pueden utilizar nitratos. Los hongos generalmente crecen en el laboratorio sobre medio definido que contiene azúcares, como glucosa y sacarosa, o sobre polímeros, como celulosa y medios complejos no definidos incluyendo el medio agar con dextrosa y papa y medios basados en vegetales. Otros nutrientes minerales importantes requeridos por los hongos para un máximo rendimiento incluyen: fósforo, azufre, potasio y magnesio. También se requieren para el funcionamiento de las enzimas en condiciones de crecimiento rápido, nutrientes menores como el zinc, cobre, molibdeno, y vitaminas.

2.5.1 Degradación de polímeros

Una de las principales características fisiológicas de los hongos es su capacidad de degradar polímeros simples y complejos. Esta habilidad es la que hace que la actividad de los hongos sea de gran importancia para el reciclaje de substratos de carbono en la naturaleza.

La celulosa es el polímero individual más importante de las plantas, constituyendo entre el 40-50% de la pared celular de la planta madura. Consiste en un único monómero, glucosa, unido por enlace $\beta(1-4)$. Una molécula de celulosa consiste en cadenas lineales de alrededor de 3,000 unidades de glucosa que pueden encontrarse al azar (celulosa amorfa) o en apretadas microfibrillas (celulosa cristalina). La degradación de la celulosa se lleva a cabo por dos enzimas que son producidas normalmente por los hongos, la endo- β -glucanasa y la β -glucosidasa. Las endoglucanasas hidrolizan las cadenas de celulosa a unidades más pequeñas, como el dímero

celobiosa y el trímero celotriosa. La celobiosa es luego cortada por la β -glucosidasa y la glucosa libre puede ser tomada por la célula como fuente de carbono. La degradación de la celulosa cristalina que existe naturalmente supone la acción de una tercera enzima, la exo- β -glucanasa que escinde dos unidades sucesivas de azúcares (celobiosa) de los extremos de las cadenas de celulosa. Los hongos celulolíticos son comunes, siendo los más activos especies de *Chaetomium*, *Fusarium*, *Myrothecium* y *Trichoderma*. La celulasa es considerada más bien un complejo de enzimas, las cuales son inducibles, es decir, son solamente formadas en la presencia del substrato (celulosa) [Wainwright, 1995].

La lignina es el segundo polímero natural más abundante en el planeta después de la celulosa. Es más resistente y difícil de descomponer que la celulosa. La molécula de la lignina es un polímero tridimensional formado por tres bloques principales: los cinnamil alcoholes, que tienen una estructura de fenil-propano (C6-C3). Estos están unidos por uniones “-c-c-” o por uniones “-c-o-c-” entre dos anillos, dos cadenas laterales de propano o un anillo y una cadena lateral. A veces existe más de una unión entre cualquiera de los dos bloques. La molécula de lignina es por consiguiente muy compleja, así que no es sorprendente que sólo relativamente pocos microorganismos, principalmente hongos y actinomicetos, posean las enzimas necesarias para llevar a cabo su degradación.

La degradación de la lignina parece implicar dos mecanismos: 1) La molécula es degradada a unidades más sencillas, o 2) Se degradan *in situ* los dobles enlaces y las cadenas laterales. La aparición de compuestos como el ácido vainílico y el coniferaldehído durante las etapas tempranas de la degradación de la lignina, sugiere que está implicado el primer mecanismo. El corte del anillo *in situ* ha sido descrito recientemente. La secuencia de la degradación de la lignina parece empezar con la desmetilación para producir ácidos difenólicos que poseen dos grupos hidroxilo adyacentes. Los anillos se abren luego por una dioxigenasa para dar una cadena alifática unida a la lignina y estas cadenas alifáticas se escinden luego del polímero mediante una oxigenasa, como la lacasa. Las cadenas laterales alifáticas son degradadas por oxidasas en forma similar. Una característica esencial de la degradación de la lignina es que es un proceso altamente oxidativo. Los principales hongos implicados en la degradación de la lignina pertenecen al grupo de los hongos de la “pudrición blanca”, siendo el mejor conocido y más ampliamente estudiado *Phanerochaete chrysosporium* (Wainwright, 1995).

2.5.2 Modo de degradación por los hongos de “pudrición blanca”

Recientemente, se ha investigado intensivamente la degradación microbiana de las lignocelulosas y el proceso y mecanismo de descomposición de la madera. La lignina es un componente esencial de las plantas vasculares y es el segundo material orgánico más abundante en la tierra. Se presenta con la celulosa en la forma de material lignocelulósico y conforma una fracción considerable de la masa total de la biosfera. Así, juega un papel altamente significativo en el ciclo del carbono. A diferencia de la celulosa y otros carbohidratos, la lignina es resistente a la degradación por la mayoría de microorganismos. La lignina puede ser convertida en humus y ser lentamente biodegradada en el suelo. También puede ser completamente catabolizada por ciertos microorganismos. Los microorganismos degradadores de lignina mejor conocidos y claramente muy importantes son los hongos degradadores de la madera que causan las “pudriciones blancas”. Hay varios cientos de especies que pertenecen a varias familias degradadoras de los *Hymenomyces*. Los hongos de la “pudrición blanca” son los únicos organismos que se sabe descomponen rápidamente la lignina (Chang *et al.*, 1980).

La lignina, a diferencia de otros polímeros que se presentan naturalmente, contiene varios tipos de enlaces intermonoméricos, la mayoría de los cuales no son fácilmente hidrolizables. Consecuentemente, es muy probable que el sistema degradador de lignina de estos hongos sea un complejo de diferentes enzimas. Pero ninguna de estas enzimas ha sido específicamente identificada. La degradación de la madera por los hongos de la “pudrición blanca” involucra la acción combinada de las enzimas degradadoras de la lignina y enzimas degradadoras de polisacáridos. El sistema enzimático degradador de lignocelulosa es de principal importancia para la colonización del substrato y la asimilación de carbono por los hongos saprófitos del suelo y de la pudrición de madera. Las enzimas degradadoras de lignina y las polisacárido-hidrolasas endodegradadoras hacen posible que los hongos penetren las paredes celulares leñosas del material vegetal, lo colonicen y utilicen. Luego, los polisacáridos vegetales a los que se ha tenido acceso son transformados por celulasas y hexocelulasas exodegradadoras en mono y disacáridos directamente transportables hacia la célula fúngica y usados como fuentes de carbono y energía. Por la naturaleza de los substratos de alto peso molecular, las enzimas degradadoras de lignocelulosa son extracelularmente activas (Chang *et al.*, 1980; Eichlerová *et al.*, 2000; Valášková & Baldrian, 2006).

Por muchos años, se consideró que las enzimas que oxidan fenol, tales como la lacasa (E.C. 1.10.3.2) y la peroxidasa (E.C. 1.11.1.7), eran las enzimas más probablemente responsables de la degradación de la lignina por los hongos de la “pudrición blanca”. Sin embargo, todavía no está claro el papel de las enzimas que oxidan fenol en la degradación de la lignina, ya que si actúan solas no fragmentan una parte considerable de la lignina. Se ha sugerido que estas enzimas que oxidan fenol pueden jugar un papel indirecto en la eliminación de los compuestos fenólicos tóxicos que pueden ser liberados de la lignina durante su descomposición, o en la regulación de la síntesis de enzimas.

Se sabe que los hongos de la “pudrición blanca” habitan las cavidades de las células de la madera, y penetran de una célula a otra vía perforaciones y a través de orificios colindantes, pero la disolución de la sustancia de la pared celular resulta principalmente del adelgazamiento más o menos uniforme de la pared celular del lumen hacia la lámina media compuesta. Así, los cambios en la lignina de la madera en cualquier momento durante la descomposición están limitados solamente a una pequeña porción de la lignina total y el grueso de la lignina permanece estructuralmente sin cambio (Chang *et al.*, 1980). Se concluye así que las reacciones de degradación son principalmente oxidativas, con la formación de cantidades considerables de ácidos carboxílicos, tanto aromáticos como alifáticos en el polímero de lignina. En la degradación de las moléculas de lignina pueden ser operativos varios modos de reacciones de degradación. Estas incluyen degradación oxidativa de las cadenas laterales con la formación de funciones carboxílicas aromáticas, descomposición de β -aril éteres, y modificación oxidativa de estructuras de cadenas laterales, y probablemente desdoblamiento oxidativo de anillos a grupos ácidos carboxílicos.

Liese (1970) distinguió dos tipos distintos de patrones de descomposición encontrados en la madera con la “pudrición blanca”: 1) Eliminación simultánea de todos los componentes de pared celular, y 2) una eliminación selectiva de la lignina y hemicelulosa. En efecto, los *Basidiomicetes* de la “pudrición blanca” varían grandemente en su capacidad para causar diferentes patrones micromorfológicos de descomposición. La biodegradación de la lignina es un proceso de múltiples pasos que involucra una cantidad desconocida de enzimas extra- e intracelulares y varias de sus isoformas, pero se desconoce el papel exacto de las enzimas individuales y su relativa contribución al proceso degradador (Eichlerová *et al.*, 2000).

2.6 Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol:dioxígeno oxidorreductasa) pertenecen a la llamada familia cobre-azul de oxidasas. Son glicoproteínas de naturaleza ubicua, se han reportado en las plantas superiores y virtualmente en todos los hongos estudiados. Sin embargo, hay muchos grupos taxonómicos o fisiológicos de hongos que típicamente no producen cantidades significativas de lacasas o donde la lacasa sólo es producida por unas cuantas especies. Nunca se ha demostrado la producción de lacasa en los hongos inferiores, esto es, *Zygomycetes* y *Chytridiomycetes*. Sin embargo, este aspecto todavía no se ha estudiado en detalle. Una enzima de este grupo fue descrita por primera vez a finales del siglo XIX por Yoshida, como un componente de los conductos de resina del árbol de laca *Rhus vernicifera*. Más recientemente, se han identificado proteínas con características típicas de lacasas en insectos y procariotes (Riva, 2006; Baldrian, 2006).

Las lacasas son oxidoreductasas que pertenecen a las oxidasas multinucleares que contienen cobre; catalizan la oxidación monoelectrónica de sustratos (fenoles y aminas aromáticas o alifáticas) a expensas del oxígeno molecular. El proceso redox tiene lugar con la ayuda de un grupo de cuatro átomos de cobre que forman el centro catalítico de la enzima; también confieren el típico color azul de estas enzimas debido a la intensa absorción electrónica de los enlaces "Cu-Cu". El resultado total del ciclo catalítico es la reducción de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua y la oxidación concomitante de cuatro moléculas de sustrato para producir cuatro radicales. Estos productos intermedios reactivos pueden producir luego dímeros, oligómeros y polímeros. Las lacasas contienen tres centros de cobre, sitios T1, T2 y T3. Los sitios T2 y T3 forman un grupo de cobre trinuclear en el que se reduce el oxígeno. El centro de cobre T1 oxida el sustrato reductor y transfiere los electrones generados a los centros de cobre T2 y T3. La catálisis involucra la unión de un sustrato reductor a la cavidad T1 y subsecuente reducción del Cu(II) a Cu(I) en el sitio T1, luego transferencia electrónica interna de T1 al grupo T2/T3, y finalmente, la unión y subsecuente reducción de un O₂ a H₂O en el grupo T2/T3. Las lacasas de diferentes hongos muestran variaciones importantes en sus propiedades, tales como potenciales redox, constantes cinéticas, especificidad de sustrato, pH óptimo (Riva, 2006; Tinoco *et al.*, 2001).

2.6.1 Función fisiológica de las lacasas

Estos biocatalizadores, que pueden ser secretados o ser intracelulares, son diferentes en los diversos organismos pero todos ellos catalizan procesos de polimerización o despolimerización. Se ha propuesto que las lacasas están involucradas en la esclerotización de la cutícula en los insectos, y en el montaje de esporas resistentes a la UV en especies de *Bacillus*. Las lacasas se encuentran típicamente en plantas y hongos. En las plantas están involucradas en la formación de la pared celular y, junto con las peroxidadas, en la lignificación. Las lacasas vegetales participan en los mecanismos basados en radicales de la formación de polímeros de lignina, mientras que en los hongos se ha sugerido la participación de las lacasas en el rápido crecimiento celular, formación de primordios, patogénesis y eliminación de contaminantes. Las lacasas probablemente tienen más papeles que incluyen la morfogénesis, la interacción patógeno fúngico de vegetales/hospedero, defensa del estrés y no hay duda que las lacasas están entre las principales enzimas involucradas en los procesos de deslignificación por los hongos de la “pudrición blanca”. Adicionalmente, estas enzimas pueden proteger a los patógenos fúngicos de las fitoalexinas y taninos tóxicos, así son un importante factor de virulencia en muchas enfermedades fúngicas (Baldrian, 2006; Das *et al.*, 1997; Riva, 2006).

2.6.2 Aplicaciones de las lacasas

El interés en estas enzimas esencialmente eco-compatibles, ya que funcionan con el oxígeno y producen agua como el único subproducto, ha crecido significativamente en años recientes. Sus usos abarcan la industria textil, de pulpa y papel, alimentaria e, incluso, en los procesos de biorremediación. Las lacasas también tienen usos en la síntesis orgánica, donde sus substratos típicos son fenoles y aminas, y los productos de reacción son dímeros y oligómeros derivados del acoplamiento de productos intermedios radicales reactivos. El aumento en el conocimiento de estas enzimas promoverá en el futuro los procesos industriales basados en lacasas. Por otra parte, se ha publicado en la última década una cantidad significativa de reportes que se han enfocado en las propiedades bioquímicas de estas proteínas y/o en sus aplicaciones en los procesos tecnológicos y de biorremediación, además de su uso en reacciones químicas (Riva, 2006).

Las lacasas de hongos llaman mucho la atención debido a su posible involucramiento en la transformación de una amplia variedad de compuestos fenólicos, incluyendo la lignina polimérica y sustancias húmicas. Hasta ahora, se han purificado más de 100 enzimas de cultivos

fúngicos, y se han caracterizado en términos de sus propiedades bioquímicas y catalíticas. La mayoría de las especies fúngicas ligninolíticas producen constitutivamente al menos una isoenzima de lacasa y las lacasas también son dominantes entre las enzimas ligninolíticas en el ambiente del suelo. Las isoformas de lacasa varían entre especies y dentro de especies, dependiendo de las condiciones de cultivo (Baldrian, 2006).

Los hongos de la “pudrición blanca” son de particular interés debido a su capacidad para degradar la lignina. Las enzimas degradadoras de la lignina también pueden degradar varios compuestos orgánicos incluyendo xenobióticos. El potencial uso biotecnológico de los hongos de la “pudrición blanca” ha llamado mucho la atención durante las últimas décadas, pero entre las especies probadas hasta ahora, sólo unas cuantas son potencialmente útiles en el suelo contaminado. La mayor parte de los experimentos de biodegradación *in situ* han usado *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, y *Pleurotus ostreatus*. Estas especies se caracterizan por su capacidad para colonizar suelo que contenga una microbiota nativa (Baldrian, 2004).

Además de una especificidad de sustrato generalmente baja, la lacasa tiene otras propiedades que hacen a esta enzima potencialmente útil para la aplicación biotecnológica. Estas incluyen el hecho de que la lacasa, a diferencia de las peroxidases, no necesita la adición o síntesis de un cofactor de bajo peso molecular, como el peróxido de hidrógeno, ya que su sustrato (el oxígeno) está generalmente presente en su ambiente. La mayoría de las lacasas son enzimas extracelulares, lo que hace muy fácil los procedimientos de purificación, y las lacasas generalmente exhiben un considerable nivel de estabilidad en el ambiente extracelular. La expresión inducible de la enzima en la mayoría de las especies fúngicas también contribuye a la fácil aplicabilidad en los procesos biotecnológicos (Baldrian, 2006).

2.6.3 Lacasas y la interacción entre microorganismos

Bajo condiciones naturales, los hongos de la “pudrición blanca” colonizan sustratos lignocelulósicos y sus hifas pueden penetrar el suelo. El suelo es también el principal ambiente para los hongos de la “pudrición blanca” que descomponen subproductos húmicos. En ambos casos, estos hongos interactúan con otros microorganismos. La mayoría de los estudios sobre las interacciones se han enfocado a hongos que pudren madera u hongos de biocontrol, por ejemplo, *Trichoderma*. El aumento en la degradación de xenobióticos ocurre cuando se cocultivan los

hongos de la “pudrición blanca” y microorganismos indígenas del suelo, y se ha reportado actividad ligninolítica en suelo no estéril. Sin embargo, nunca se ha estimado directamente la influencia de los microorganismos del suelo sobre las enzimas ligninolíticas (Baldrian, 2004).

Se ha encontrado incremento en la actividad de lacasa durante las interacciones entre dos hongos de la “pudrición blanca”, o un hongo de la “pudrición blanca” y una especie de biocontrol, tal como *Trichoderma*, y parece que la lacasa podría estar generalmente involucrada en relaciones interespecíficas de los hongos de la “pudrición blanca” (Baldrian, 2004).

2.7 *Pleurotus* y enzimas

Los hongos crecen en materia orgánica muerta de origen vegetal. Por lo tanto, pueden utilizar casi todos los sustratos y desechos agrícolas. Durante el crecimiento del micelio y el desarrollo de los cuerpos fructíferos, se sabe que ocurren cambios bioquímicos y como resultado se secretan enzimas extracelularmente. Esto para degradar los materiales insolubles de los sustratos a moléculas simples y solubles, que son subsecuentemente utilizadas por enzimas intracelulares. Las enzimas juegan así un papel significativo en el desarrollo de los hongos (Kuforiji & Fasidi, 2007).

Los *Basidiomycetes* de la “pudrición blanca” son microorganismos capaces de degradar eficientemente la lignina. Sin embargo, el diferente grado de degradación de la lignina con respecto a otros componentes de la madera, depende mucho de las condiciones ambientales y la especie fúngica involucrada. Ahora está claro que no hay un mecanismo único para lograr el proceso de degradación de la lignina y que la maquinaria enzimática de los diversos microorganismos es diferente. El hongo de la “pudrición blanca” *Pleurotus ostreatus* es un basidiomiceto conocido por su capacidad para degradar desechos lignocelulósicos agro-industriales, que están principalmente compuestos por celulosa, hemicelulosas y lignina. Generalmente, se cultiva en paja de trigo, pero otros sustratos, tales como tallos de algodón, han resultado adecuados para su crecimiento. La colonización fúngica de estos sustratos tiene implicaciones económicas de largo alcance. En efecto, además de la tradicional producción de cuerpos fructíferos de alto valor nutricional, la biodegradación de la lignocelulosa hace al compost degradado por los hongos un material potencialmente explotable para la alimentación animal. Efectivamente, como consecuencia de la degradación selectiva de la lignina y hemicelulosas, la celulosa del sustrato queda más expuesta y puede ser utilizada por los

rumiantes. *Pleurotus ostreatus* pertenece a una clase de microorganismos degradadores de lignina que producen lacasas, manganeso-peroxidasas, y veratril alcohol oxidasas pero no lignino peroxidasas (Locci *et al.*, 2007; Palmieri *et al.*, 1997).

El género *Pleurotus* incluye especies comestibles y medicinales que pertenecen al grupo de los hongos de la “pudrición blanca” debido a su capacidad para producir enzimas ligninolíticas extracelulares: lacasas, peroxidasas (peroxidasa manganeso-dependiente, peroxidasa versátil), y aril-alcohol oxidasa. Gracias a esta capacidad, algunas especies de *Pleurotus* se cultivan comercialmente en diferentes materiales lignocelulósicos, tales como aserrín, productos de papel y la mayoría de desechos agrícolas que se producen en enormes cantidades en todo el mundo. Las fuentes de carbono en el medio juegan un importante papel en la producción de enzimas ligninolíticas. Se ha demostrado que el uso de fructosa en vez de glucosa da por resultado un incremento de 100 veces en la actividad específica de lacasa de *Basidiomycetes*. Las enzimas ligninolíticas se producen durante el metabolismo secundario bajo condiciones de nitrógeno limitado. Sin embargo, en *Pleurotus ostreatus* una alta concentración en el medio (34 mM, N como glutamato) no reprimía, sino más bien estimulaba ligeramente la mineralización de la lignina en comparación con el medio limitado en nitrógeno. Asimismo, se ha demostrado que la producción de lacasas y peroxidasas depende de las especies y cepas del género *Pleurotus*, las condiciones de cultivo (fermentación sumergida o fermentación de estado sólido), y de las fuentes de carbono, así como las fuentes y concentraciones de nitrógeno (Stajić *et al.*, 2006). Ya se han identificado, purificado, y clonado unas diversas lacasas de *Pleurotus* spp. (Das *et al.*, 1997).

2.7.1 *Pleurotus*, enzimas y otros microorganismos

Diversos estudios han reportado mayor mineralización y colonización del sustrato donde *Pleurotus* se cultivaba con microbiota del suelo. En la presencia de bacterias, *Pleurotus* puede reaccionar de varias formas. En cultivos duales de *Pseudomonas* y *Lentinula edodes*, las enzimas líticas fúngicas degradan la pared bacteriana. Recientemente, se ha reportado un efecto positivo sobre el crecimiento micelial de *P. ostreatus* inducido por la presencia de *Pseudomonas fluorescens* (Velásquez-Cedeño *et al.*, 2004).

Se ha descrito la producción de lacasas como una respuesta al estrés ambiental. También se ha reportado que una adaptación preliminar de *Pleurotus* spp. a los metabolitos de

Trichoderma spp. conducía a la inducción de la producción de lacasa. Velásquez-Cedeño *et al.* (2004) encontraron que la capacidad de *T. longibrachiatum* para competir en cultivos duales disminuía en la presencia de otros microorganismos en los sustratos. El efecto antagónico de las bacterias de los sustratos de hongos ha sido previamente observado y éste puede ser usado por los productores de hongos para cultivar hongos bajo condiciones no estériles. La estimulación de las actividades de lacasa en el sustrato pasteurizado podría contribuir al mejoramiento de la capacidad de *Pleurotus ostreatus* para competir en el sustrato pasteurizado, además del efecto directo de las bacterias sobre *T. longibrachiatum*. Esto podría ser debido a que las polifenoloxidasas son enzimas que catalizan reacciones de oxidación que producen radicales. Estos radicales son compuestos químicos altamente reactivos, que pueden conducir a perturbaciones de membrana. Se ha registrado un incremento de la actividad de lacasa *in vitro*, en cultivos duales de *P. ostreatus* y *T. longibrachiatum*. Una isoforma de lacasa se produce más rápido cuando se cultiva *P. ostreatus* con *T. longibrachiatum*. Se debe intentar mejorar el desarrollo en los sustratos de cultivo de cepas bacterianas que pudieran inhibir el desarrollo de *Trichoderma*, así como promover el desarrollo de los hongos comestibles, produciendo así mejores rendimientos (Velásquez-Cedeño *et al.*, 2004).

2.7.2 Estimulación de producción de enzimas por desechos lignocelulósicos

Recientemente, una extensa investigación sobre hongos basidiomicetos se ha dirigido hacia el objetivo de aislar nuevos organismos con enorme secreción de enzimas ligninolíticas, así como enzimas con importantes propiedades para su aplicación. Las principales enzimas asociadas con la capacidad degradadora de lignina de hongos de la “pudrición blanca” son la lignina peroxidasa, manganoso peroxidasa y lacasas. Algunos hongos de la “pudrición blanca” producen todas estas enzimas, mientras otros producen sólo una o dos de ellas. *Lentinula edodes* (*shiitake*) y *Pleurotus* spp. (“setas”) comprenden grupos de hongos comestibles con propiedades medicinales importantes y aplicaciones biotecnológicas y medioambientales. Pueden producir las enzimas extracelulares hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas) y oxidativas (ligninolíticas) requeridas para degradar los principales componentes de la biomasa lignocelulósica a los compuestos de bajo peso molecular que puedan asimilarse para la nutrición de los hongos. Es importante evaluar la actividad de enzimas hidrolíticas y oxidativas de *Basidiomycetes* mientras se cultivan en la presencia de lignocelulosa, ya que en los sustratos vegetales lignificados la

celulosa, hemicelulosas, y lignina se encuentran ligadas. Además, el entendimiento de los mecanismos fisiológicos que regulan la síntesis enzimática en la bioconversión de lignocelulosa podría ser útil para mejorar el proceso tecnológico de producción de estos hongos comestibles. Recientes estudios han mostrado que algunos desechos lignocelulósicos estimulan la producción enzimática por *Basidiomycetes*. Al comparar especies de *Pleurotus* y *Lentinula edodes* de diversos orígenes por primera vez en cuanto a su capacidad de producir enzimas lignocelulolíticas en fermentación sumergida (SF) y de estado sólido (SSF) de diversos materiales vegetales crudos, se demostró que la naturaleza del material lignocelulósico y el método de cultivo de hongos son factores que determinan la expresión del potencial lignocelulolítico de los hongos, así como la proporción de enzimas individuales en el complejo enzimático. La SSF de hojas de árbol es favorable para la secreción de lacasa y MnP por la mayoría de cepas de *Pleurotus* y *L. edodes*, mientras que la SF proporciona mejor producción de enzimas hidrolíticas (Elisashvili *et al.*, 2008).

En cultivos fúngicos frecuentemente se puede inducir la actividad de lacasas añadiendo varios compuestos aromáticos al medio de crecimiento. En este aspecto, los tallos de algodón son superiores a otros desechos herbáceos para el cultivo de *Pleurotus* spp, ya que la degradación del tallo de algodón es más rápida que aquella de la paja de trigo. La actividad enzimática de *P. ostreatus* se ve grandemente afectada por los medios de cultivo, por ejemplo, cuando se cultiva en tallos de algodón, degrada principalmente lignina, mientras que, durante la colonización de la paja de trigo, reduce significativamente el contenido de hemicelulosas. El extracto de tallo de algodón (ETA) también estimula el crecimiento fúngico en medios sintéticos; el componente acelerador del crecimiento es más soluble en solventes polares y se ha caracterizado como un compuesto de tipo flavonoide. Asimismo, el ETA estimula la actividad de lacasa extracelular en cultivos sumergidos. La inducción de la actividad de lacasa en esos cultivos estuvo correlacionada con la concentración de extracto suplementado (Locci *et al.*, 2007; Ardon *et al.*, 1998).

2.8 Panorama general del cultivo de *Pleurotus* en México

2.8.1 Recursos genéticos de hongos

México es considerado un país donde converge una notable diversidad biológica, ecológica y cultural. Sin embargo, el cambio climático, la destrucción de hábitats naturales, la

pérdida del conocimiento tradicional, la biopiratería, la importación de cepas comerciales, y la escasa capacidad de conservación *in situ* e *in vitro* representan serias amenazas en el corto plazo para los recursos genéticos nativos de hongos comestibles y medicinales en México. Por si esto fuera poco, la percepción generalizada sobre la importancia de los hongos comestibles y medicinales para la sociedad aún es muy baja. Esto dificulta la obtención de financiamiento para actividades de conservación, investigación y desarrollo alrededor de los hongos comestibles y medicinales, sobre todo en un contexto de crisis económicas globales recurrentes. Así, los recursos humanos, económicos y de infraestructura que actualmente se dedican a la preservación de los recursos genéticos de hongos comestibles y medicinales son mínimos. Por otra parte, ya es posible desarrollar estrategias integrales sobre los recursos genéticos nativos de hongos comestibles y medicinales, involucrando su recolección, conservación, identificación, caracterización, y aplicaciones biotecnológicas. Pueden generarse así nuevos productos e innovaciones tecnológicas cuyo impacto sea notable, mejorando así la percepción social (Morales *et al.*, 2010). De esta forma, los Centros de Recursos Biológicos se han convertido en la pieza fundamental para el desarrollo de las ciencias biológicas y la biotecnología en el siglo XXI. Se trata de Centros que proporcionan los servicios estratégicos y el mantenimiento de células vivas, genomas de organismos, y la información relacionada con la herencia y las funciones de los sistemas biológicos.

En ese sentido a partir de 2004, el Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla inició el establecimiento de un Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC), con los siguientes objetivos: 1) Mantener y conservar el germoplasma nativo procedente de diversas regiones del país; 2) Caracterizar el germoplasma nativo a nivel molecular, principalmente el correspondiente al champiñón (*Agaricus*), *Pleurotus* y *Lentinula*, generando bases de datos asociadas; y 3) Establecer un programa de mejoramiento genético que combine herramientas de genética clásica y molecular para desarrollar una nueva generación de cepas comerciales de hongos comestibles en México.

El CREGENHC cuenta con un total de 112 cepas nativas de hongos comestibles, que representan 26 especies pertenecientes a los géneros *Agaricus*, *Armillaria*, *Auricularia*, *Calvatia*, *Coprinopsis*, *Ganoderma*, *Laetiporus*, *Lentinula*, *Neolentinus*, *Pleurotus*, *Stropharia* y *Volvariella*. Las cepas proceden de diversas regiones del país, las cuales incluyen 14 Estados de la república (Sobal *et al.*, 2007b).

2.8.1.1 Recursos genéticos de *Pleurotus*

Los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. representan un gran potencial para la agricultura y la economía de nuestro país, ya que se pueden desarrollar sobre una gran cantidad de substratos lignocelulósicos, mismos que se generan en grandes cantidades a lo largo y ancho de nuestro territorio y son útiles no sólo para la alimentación humana, sino también para otros aspectos como la alimentación animal, la medicina, la farmacia, la industria química, el control biológico, y la descontaminación de suelos (Labarère & Bois, 2002).

La sección del CREGENHC correspondiente al género *Pleurotus* está integrada por 52 cepas procedentes de los Estados de Chiapas (11), Durango (1), Hidalgo (1), Jalisco (3), México (1), Michoacán (1), Morelos (11), Nuevo León (2), Puebla (13), Tabasco (2), Tlaxcala (1), Veracruz (3), y Yucatán (2) [Sobal *et al.*, 2007b].

Con base en la información morfológica, genética y molecular disponible en el CREGENHC, se han logrado identificar seis grupos interestériles (GI) de *Pleurotus*, a partir de los 15 GI reconocidos por Vilgalys *et al.* (1996). El análisis de secuencias del ADNr (región ITS), derivado de una matriz de distancia genética, indicó la presencia de *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (GI-I), *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. (GI-II), *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn (GI-V), *P. cystidiosus* O. K. Mill. (GI-VII), *P. levis* (Berk. & M. A. Curtis) Singer (GI-VIII), y *Pleurotus* sp. (Morales *et al.*, 2010; Huerta *et al.*, 2010). Resulta interesante el caso de los recursos genéticos de *Pleurotus* que se desarrollan sobre diversas especies de *Agave* en el altiplano mexicano. Existen cuando menos tres poblaciones distintas de *Pleurotus* en este interesante nicho ecológico. Aunque el estado taxonómico de *P.* sp. requiere de un completo análisis de nomenclatura que involucre estudios morfológicos, genéticos, y moleculares. Se pueden considerar al menos dos especies estrechamente emparentadas dentro de este complejo, *P. agaves* Dennis y *P. opuntiae* (Durieu & Lév.) Sacc. Es posible que *P. djamor*, una especie ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales de México se traslape geográficamente con *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* en las tierras altas templadas, aunque esto requiere ser confirmado. Asimismo, se requieren más estudios particularmente en las regiones norte sur y oriente, a fin de tener una mejor estimación de la diversidad genética de las especies de *Pleurotus* en México (Morales *et al.*, 2010; Huerta *et al.*, 2010). Con los programas adecuados de mejoramiento, los recursos genéticos nativos representan una excelente alternativa para la industria, ante la importación de cepas comerciales de otras regiones. Asimismo, también pueden

obtenerse cepas comerciales para promover la producción de hongos comestibles y medicinales en las regiones tropicales y subtropicales del país, hasta ahora no desarrolladas. Las especies nuevas o novedosas identificadas representan una fuente potencial de valoración real del conocimiento tradicional, así como de nuevos genes y propiedades funcionales para la salud humana (Morales *et al.*, 2010).

2.8.2 Avances del cultivo

El cultivo de hongos comestibles es una actividad productiva alternativa que adquiere mayor auge en México desde el punto de vista ecológico, alimenticio y económico. La producción comercial de hongos comestibles se encuentra en su mayor parte, localizada en la región central de México. Se aprovechan grandes cantidades de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales como substrato de cultivo, tales como pajas, pulpas, bagazos y rastrojos. Substratos que se preparan para la siembra mediante fermentación aerobia y/o pasteurización con procesos tecnológicos de eficiencia variable. El cultivo de “setas” en particular, es una actividad económica con potencial de desarrollo que se realiza actualmente en la mayoría de los Estados de la república mexicana. El nivel de desarrollo tecnológico de los módulos de cultivo es variable, desde cultivadores ocasionales con instalaciones muy rústicas y producciones para autoconsumo o con unos cuantos kilogramos por semana, hasta empresas formales con módulos construidos *ex profeso* y producción constante que alcanza en el mayor de los casos las cien toneladas mensuales de “setas”. Existen probablemente menos de cien unidades de producción que superan un promedio diario de cien kilogramos en el país y se estima una producción nacional superior a 2,100 toneladas anuales. La producción rural de hongos comestibles ha dado lugar a un gran número de pequeños productores (campesinos e indígenas) con distintos tipos de organización, principalmente en el cultivo de “setas”, dada la sencillez y bajo costo de implementación del sistema utilizado. Este tipo de producción es normalmente constante, frecuente u ocasional, y una proporción importante de productores genera una producción inestable o efímera, ya que no tienen apoyos suficientes de capital, tecnología, capacitación ni asistencia técnica, tampoco planifican adecuadamente la comercialización del producto. La mayoría de los productores rurales dedican parte de la producción de hongos para el autoconsumo.

Algunas entidades federales y estatales han promovido el cultivo de setas como una estrategia de desarrollo social, otorgando el apoyo inicial para la implementación de módulos. Por otra parte, muchos cultivadores independientes han iniciado el cultivo por motivación propia. Sin embargo, a pesar de las muchas experiencias exitosas, se observa que gran cantidad de iniciativas han aparecido y desaparecido sin dejar registro (Morales *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007).

2.8.3 Dificultades encontradas en el cultivo

Existen diferentes problemas a los que se enfrenta la industria nacional de hongos comestibles que impiden su crecimiento. Algunos de los cuales están relacionados con aspectos de la comercialización y otros más referentes a los escasos estudios de investigación. Junto a la agudización de la escasez de recursos económicos, se encuentran algunos problemas añejos, tales como la desconfianza de ciertos sectores de la población por considerarlos venenosos, así como la variable y en ocasiones baja calidad del producto (Martínez-Carrera *et al.*, 1993). Dentro de esos diferentes problemas a los que se enfrenta la industria de hongos comestibles y que han limitado su crecimiento, se encuentran los relacionados con el estudio de las características propias de la cepa y como estas pueden influir sobre la comercialización. Sin embargo, otros aspectos han sido relativamente ignorados (Martínez-Carrera *et al.*, 1993). Las causas particulares por las cuales muchos de los módulos de producción antes mencionados han desaparecido sin dejar registro seguramente han sido variadas, sin embargo, sobresalen los siguientes puntos: problemas técnicos ligados a la producción, deficiencias en la disponibilidad de “semilla” de calidad, falta de personal calificado, problemas de comercialización, problemas administrativos y problemas de organización tanto interna como entre productores.

Entre los problemas directamente relacionados con la producción se encuentra las plagas y enfermedades que han provocado disminuciones en la producción de hasta 40-50% (Sánchez *et al.*, 2007; Sobal *et al.*, 2007b).

Por otra parte, prácticamente las especies preferidas por los cultivadores y los consumidores mexicanos son: *P. ostreatus*, mayoritariamente, y *P. pulmonarius*, en segundo término. Por ello es importante destacar que:

- Existe poca diversificación en cuanto a especies y variedades cultivadas comercialmente.

- Aunque hay varios reportes sobre el cultivo experimental y semicomercial de *P. djamor* (la especie silvestre más común en el país), no se han desarrollado cepas para uso comercial de esta especie.
- Se requiere trabajar más la selección de cepas y aprovechar el valioso recurso genético de *P. djamor*.
- Los cultivadores raramente utilizan diferentes cepas en función del sustrato o de la época del año. Esto podría incidir en una utilización insuficiente de la infraestructura productiva.
- Las cepas cultivadas son en su mayoría de origen extranjero, y es notorio que hace falta desarrollar cepas mejoradas para las necesidades locales (Sánchez *et al.*, 2007).

2.8.3.1 El problema de las plagas y enfermedades en México

Como las técnicas de producción de hongos comestibles en México no son tan especializadas y tecnificadas como en otros países desarrollados, esta condición puede provocar pérdidas de graves consecuencias y, eventualmente, afectar drásticamente la producción y la rentabilidad del cultivo. Algunos estudios previos demuestran que la presencia de plagas y enfermedades de las “setas” puede disminuir hasta en más de 40% la producción, y que el principal complejo contaminante está formado por los “mohos verdes”, esencialmente del género *Trichoderma*.

De aquí se deriva la importancia que tiene el identificar las especies que se encuentran contaminando los cultivos de hongos comestibles en nuestro país, evaluar la capacitación de los productores y establecer las medidas preventivas y de control para evitar principalmente la infestación de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, especie responsable de grandes pérdidas económicas desde los 1980s provocando el cierre de innumerables plantas productoras y afectando la producción de hongos comestibles alrededor del mundo (Ortega-Garrido, 2002). No existen variedades resistentes a estos contaminantes y el empleo de productos químicos no es aconsejable, por lo que el mejor medio de control es la buena preparación del sustrato y el empleo de medidas preventivas.

Los insectos son también un problema que agobia a los productores, sobre todo en las instalaciones de tipo rústico. En general, es necesario reforzar la capacitación y la asistencia a los productores y difundir información relacionada para que la persona a cargo del módulo esté

capacitada para manejar su situación particular. El primer paso para un eficiente manejo integrado de plagas es la búsqueda de información y del conocimiento de la plaga en cuestión (Fletcher *et al.*, 1986).

A partir de 1996, el grupo de investigación del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, inició investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el problema causado por la presencia de *Trichoderma* spp. en la producción comercial de hongos comestibles en México, ya que como se ha mencionado, diversas especies de *Trichoderma* ocasionan serias pérdidas económicas, tanto a pequeños como a grandes productores de hongos comestibles. La mayor parte de los registros corresponden a plantas rústicas productoras de setas, donde se han reportado problemas de contaminación por *Trichoderma* hasta en 33% de los productores de la región central del país (Sobal *et al.*, 2007b).

En el estudio de Ortega-Garrido (2002) en siete plantas productoras de hongos de los Estados de México, Morelos, Puebla, Tlaxcala y Veracruz, se observó que *Trichoderma* spp. se encuentra en el 75% de las plantas estudiadas, principalmente en las áreas de incubación-producción (62.5%), alcanzando hasta el 50% de incidencia en las unidades de producción muestreadas. Por su parte, *Coprinus* spp. se presenta en el 25% de las plantas en la fase de incubación-producción. En el 37.5% de las plantas se encontró *Pseudomonas* spp. en las áreas de producción. En cuanto a la incidencia de plagas, se observó la presencia de mosquitas de los géneros *Lycoriella* spp. y *Drosophyla* spp. en el 100% de las plantas, principalmente en el área de producción.

Con relación al control de mohos, la gran mayoría de los productores aplica el fungicida Benlate (35.5% del ingrediente activo benomilo), aplicado sobre el substrato antes de la siembra ó como aspersión diluida durante la pasteurización (10 g/200 L de agua) para intentar controlarlos. Sin embargo, esta medida no ha sido muy eficiente, debido probablemente a que los mohos han generado resistencia al producto (Ortega-Garrido, 2002).

En 2004, el grupo de investigación del Colegio de Postgraduados detectó la presencia de cepas agresivas micoparásitas de *T. aggressivum* f. *aggressivum*, identificada con técnicas clásicas y moleculares, en muestras de substrato (compost) contaminado proporcionado por la empresa Hongos de México, S. A. Esta empresa, cuyos volúmenes de producción ascienden a 55 toneladas de champiñones por día, ha llegado a tener disminuciones hasta del 50% en su

producción y pérdidas económicas millonarias debido al ataque de *T. aggressivum* f. *aggressivum* (Sobal *et al.* 2007b).

2.8.4 Selección y mejoramiento genético

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm. y especies emparentadas dentro del complejo de *P. ostreatus*, son hongos comestibles comercialmente importantes en muchos países del mundo. Dado el interés que despierta la producción de *Pleurotus*, sobre todo por la motivación de posibles exportaciones hacia mercados internacionales y por el aprovechamiento que pudieran hacer diferentes grupos organizados de agricultores, y porque actualmente la mayoría de cepas de hongos comestibles usados en Latinoamérica son importados de otras regiones, principalmente de Europa, Norteamérica, y el Sureste de Asia, se hace necesaria la necesidad de fortalecer esta tecnología con cepas autóctonas eficientes (Matsumoto *et al.*, 1995). Por otra parte, el cultivo potencial de especies de *Pleurotus* en los países subtropicales parece prometedor, por lo que la propiedad para fructificar a temperaturas elevadas es una característica esencial para el cultivo de hongos en los países subtropicales y tropicales, donde el costo de comprar y operar equipo de enfriamiento lo haría prohibitivo. Esta es la razón de evaluar y seleccionar cuidadosamente material biológico silvestre, capaz de adaptarse exitosamente a las necesidades individuales de cada área especialmente de cepas locales, que sólo requieran de un mínimo trabajo de cruzamiento, antes de ser incluidas en un proceso de producción comercial (Zervakis & Balis, 1992). En México, dada la importancia que ha tenido en los últimos años el cultivo y comercialización de especies del género *Pleurotus* en regiones tropicales, actualmente, una de las líneas de mayor interés sobre el tema es la selección y mejoramiento genético de cepas con altos rendimientos adaptadas a estas condiciones ambientales (Gaitán-Hernández & Salmones, 1996).

El desarrollo de nuevos y mejores cultivares de *Pleurotus* es importante para promover su producción comercial. Aunque los aislamientos silvestres de *P. ostreatus* pueden proporcionar valiosos recursos genéticos para propósitos de reproducción, ha habido poca investigación básica respecto al parentesco genético intraespecífico entre ellos (Matsumoto *et al.*, 1995). El aislamiento y mejoramiento genético convencional de cepas nativas son recientes, están muy poco desarrollados y se caracterizan por una falta de estudios moleculares. En este caso, la

colecta y la evaluación de los recursos genéticos nativos representa un paso muy importante para la optimización de la producción local a escala comercial, no sólo porque se pueden obtener aislamientos bien adaptados y alta calidad para la producción de semilla, sino también para el manejo y conservación del germoplasma fúngico nativo (Hernández-Ibarra *et al.*, 1995; Martínez-Carrera, 2000). El trabajo intensivo de reproducción sobre cepas nativas que involucre genética clásica y molecular es una prioridad máxima, particularmente respecto a la tolerancia a elevadas temperaturas y resistencia a hongos competidores (especialmente *Trichoderma* spp.), ya que como ya se mencionó, las cepas comerciales ahora disponibles son importadas de países templados y son más susceptibles a una variedad de plagas y enfermedades (Martínez-Carrera, 2000).

Por otra parte, las cepas silvestres de hongos comestibles deben ser “domesticadas”, toda vez que no son eficaces para el cultivo masivo por su producción baja, inestable y con características de poco valor comercial. A diferencia de lo que sucede con las plantas, se requiere de relativamente poco tiempo de investigación sistematizada para seleccionar y adaptar los hongos al cultivo a gran escala, puesto que sus ciclos de vida son bastante cortos (12-30 días). Dicha domesticación se lleva a cabo por medio de un proceso de selección dirigida de las características deseadas, tales como alto rendimiento, crecimiento rápido, resistencia a enfermedades, valor nutritivo y textura, olor y color de los cuerpos fructíferos (Martínez-Carrera *et al.*, 1993).

Un aspecto adicional es que los hongos comestibles, en particular, los de la “pudrición blanca” como *Pleurotus*, secretan diversas enzimas que les permiten degradar substratos lignocelulósicos. Un mayor conocimiento de este sistema multienzimático podría llevar a modificar y mejorar procesos como la producción de hongos comestibles y la degradación de desechos lignocelulósicos.

2.9 La cultura y los hongos comestibles

En un sentido general, el término “cultura” se define como un comportamiento y pensamiento humano socialmente imitado con las propiedades de ser compartido, simbólico, integrado, aprendido, transmitido trans-generacionalmente y adaptable. De estas características, las últimas tres se reflejan en la aparición, permanencia o extinción de los usos de los recursos naturales (Bodley, 2005).

Los hongos han sido un recurso que desde tiempos antiguos, el hombre ha utilizado como alimento, como medicamento o con un fin religioso. Los hongos han estado presentes en la vida

del hombre desde tiempos remotos, lo que se puede comprobar con las figurillas de barro del año 100 a. C. El hombre fue conociendo a los hongos por ensayo y error, lo que en ocasiones tuvo graves consecuencias, de modo que poco a poco fue seleccionando los hongos que le eran útiles, y al recolectarlos, dispersaban segmentos de ellos por la zona para poder asegurar tener ese recurso en otra ocasión. Este procedimiento fue una forma muy empírica de poder producir los hongos comestibles, que incluso esa práctica se sigue haciendo aún en nuestros días, en las comunidades cercanas a los ecosistemas donde en forma natural se desarrollan los hongos. Así, los hongos han formado parte de las relaciones históricas del hombre y su medio ambiente (Chang & Miles, 1989; Furst et al., 1995; Oei, 1996).

El significado cultural (SC) es una clave en la etnobiología cuantitativa que ofrece la posibilidad de hacer inferencias acerca de los sistemas tradicionales de nomenclatura, uso, apropiación y valoración de los recursos naturales. El significado cultural de un organismo ha sido definido como la importancia del papel que el organismo juega dentro de una cultura particular (Hunn, 1982).

El primer modelo teórico del SC parte de las siguientes suposiciones: SC es igual a uso, cuando “el uso” se interpreta en su contexto más general, lo que quiere decir que conocer algo es usarlo. El SC varía en cantidad, intensidad y exclusividad. El producto de estas tres variables determina el “valor de uso” de cada uso, así el Índice de SC de un organismo es la suma de sus “valores de uso” (Turner, 1988).

En el caso de los hongos comestibles, este índice puede contener entre otras variables las siguientes: frecuencia de mención, percepción de abundancia, frecuencia de uso, sabor, uso como alimento multifuncional, transmisión de conocimiento, salud y economía. La aplicación adecuada de cuestionarios que incluyan preguntas sobre las variables mencionadas a una muestra de informantes de la comunidad en estudio podrá proporcionar una imagen del SC que tienen los hongos comestibles en dicha comunidad o grupo étnico.

Los hongos comestibles se recolectan en más de 80 países alrededor del mundo. Su valor estimado de venta es de aproximadamente 2 mil millones de dólares al año. En las áreas rurales, particularmente en los países no desarrollados, los ingresos obtenidos por los hongos completan la economía de las familias pobres (Boa, 2004). Por esa razón, se puede esperar que el valor monetario de los hongos pudiera afectar considerablemente su SC en los lugares donde se comercializan. Es difícil calcular el número de géneros de hongos comestibles, y todavía más difícil calcular el número de especies de hongos que producen setas lo suficientemente sabrosas y numerosas como para ser consideradas útiles como alimento, ya que los gustos y costumbres locales influyen en la aceptabilidad de una especie de hongo comestible. Así, qué tan comestible es un producto representa un atributo subjetivo influenciado por la costumbre y la cultura (Chang & Miles, 1989).

En México, aproximadamente 30 hongos (incluyendo líquenes) se usan con propósitos medicinales (Guzmán, 1994), no se les aplica el concepto de medicina-alimento. O sea, ningún hongo se consume como nutriente y medicina al mismo tiempo. Esto contrasta con Asia (Corea, Japón y China) donde esto es bastante común y casi 300 especies fúngicas se usan como

medicina (Ying et al.,1987). La gente siempre está consciente de que un error en la identificación de hongos podría ser fatal. Los hongos comestibles silvestres forman parte de la diversidad biológica, ecológica y cultural de México, han constituido parte importante de una estrategia tradicional de subsistencia, la cual data de épocas prehispánicas y que se basa en el uso múltiple de los recursos naturales. Evidencias de su uso pueden situarse desde épocas prehispánicas, plasmadas en códices indígenas, en la época colonial con las descripciones de soldados y misioneros españoles del siglo XVI y a finales del siglo XIX y principios del siglo XX como los trabajos de algunos naturalistas extranjeros. Es decir existe una tradición micófaga. Muchas de estas tradiciones se mantienen hasta nuestros días, mediante prácticas familiares de recolección en épocas debidamente caracterizadas. Estas prácticas desarrolladas por los “hongueros”, como se les conoce a los recolectores de hongos, se realizan con fines de autoconsumo o comercialización a baja escala, en los mercados populares de poblaciones aledañas. De la misma manera, como seguramente se realizaban en los mercados prehispánicos. Sin embargo, dicha tradición, vasto conocimiento y riqueza de especies se está perdiendo paulatinamente, debido a la destrucción de las regiones boscosas del país y al proceso de transculturación a que están siendo sometidos los grupos étnicos (Villarreal L. & Pérez-Moreno, 1989).

2.9.1 La producción de hongos comestibles y la transformación cultural

La palabra producción se refiere a la acción de producir, crear, elaborar, fabricar, engendrar, criar; y en el caso de la producción de hongos comestibles, es el proceso por el cual se obtienen los hongos que se desean, en una forma controlada o semicontrolada, ya sea a pequeña o a gran escala.

El aprovechamiento energético es el motor de las transformaciones culturales, ya que estimula la transformación de la tecnología disponible, tendiendo siempre a mejorar. Así, la cultura está determinada por la forma en la que el grupo humano aprovecha su entorno, obteniendo de éste energía. Y en el caso de la producción de hongos comestibles, se puede considerar que es una forma inteligente de aprovechar el entorno y obtener energía, ya que por una parte, se están empleando los residuos agrícolas y agroindustriales, evitando contaminar el ambiente, lo cual implica ahorrar energía, tanto para el hombre, como del ecosistema, ya que se resuelve el problema en gran parte de la degradación de dichos materiales, gracias a la capacidad degradadora de los macromicetos. Por otra parte, se están obteniendo los cuerpos fructíferos del hongo, en un corto tiempo, con el uso de una cantidad limitada de agua, en un espacio reducido, lo cual refleja el manejo de ciertos conocimientos referentes al ciclo de vida de este tipo de organismos, obteniendo eficientemente energía, traducida como alimento. Y, finalmente, el substrato degradado, en vez de representar un problema para el hombre, resulta ser un alimento enriquecido para el ganado, a un costo bajo; o bien un excelente abono orgánico para la tierra de cultivo, acortando los tiempos para los ciclos del nitrógeno y el carbono. Por otra parte, este tipo de substratos degradados por los hongos comestibles también pueden favorecer a la degradación de substancias contaminantes, como colorantes e hidrocarburos.

III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

México es un país de notable diversidad biológica, ecológica y cultural. En este contexto, los hongos comestibles representan un importante recurso genético, el cual es apreciado y consumido por las comunidades indígenas y campesinas, así como por la sociedad en general. Todas las especies de hongos comestibles producidas comercialmente en México han sido importadas de diversas regiones, tales como Europa, Norteamérica y el E y SE de Asia. A la fecha, no existen estudios en el país sobre el potencial de los recursos genéticos nativos de especies de hongos comestibles ampliamente valoradas por el conocimiento tradicional de las comunidades, empleando metodologías modernas para su identificación. El análisis a profundidad de estos recursos genéticos permitiría diversificar las especies de hongos comestibles comercialmente cultivados en México, y determinar nuevas características y propiedades que pueden derivar en diversas aplicaciones biotecnológicas. Este sería el caso, por ejemplo, de nuevas cepas de hongos comestibles con resistencia genética al ataque del “moho verde” (*Trichoderma aggressivum*), el cual representa una seria amenaza para el cultivo de hongos comestibles a pequeña y gran escala en México.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

- Es posible producir en condiciones de laboratorio los recursos genéticos nativos de los “Hongos del Maguey” de la región central de México, los cuales pueden ofrecer mayor o igual adaptabilidad a las condiciones locales que las cepas extranjeras cultivadas actualmente.
- Las cepas nativas de *Pleurotus* aisladas de plantas de *Agave* presentan más resistencia genética natural al ataque del “moho verde” *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* que la cepa comercial.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Caracterizar y seleccionar cepas de *Pleurotus* comercialmente competitivas para la producción rural y el mercado nacional, a partir de los recursos genéticos nativos apreciados y consumidos por las comunidades indígenas y campesinas.

Objetivos Particulares:

- Recolectar, aislar, caracterizar, identificar y seleccionar especies de *Pleurotus* que formen parte del conocimiento tradicional de las comunidades rurales de la región central de México.
- Recolectar, aislar, caracterizar, e identificar cepas agresivas del “moho verde” (*Trichoderma aggressivum*), las cuales ocasionen problemas de producción y pérdidas económicas a los productores de hongos comestibles en México.
- Establecer una estrategia para incorporar las cepas seleccionadas a nivel campo, para que puedan ser utilizadas en las plantas rústicas de productores rurales de hongos comestibles.

V. METODOLOGÍA

El esquema de trabajo que se siguió en la presente investigación se muestra en la **Figura 5.1**.

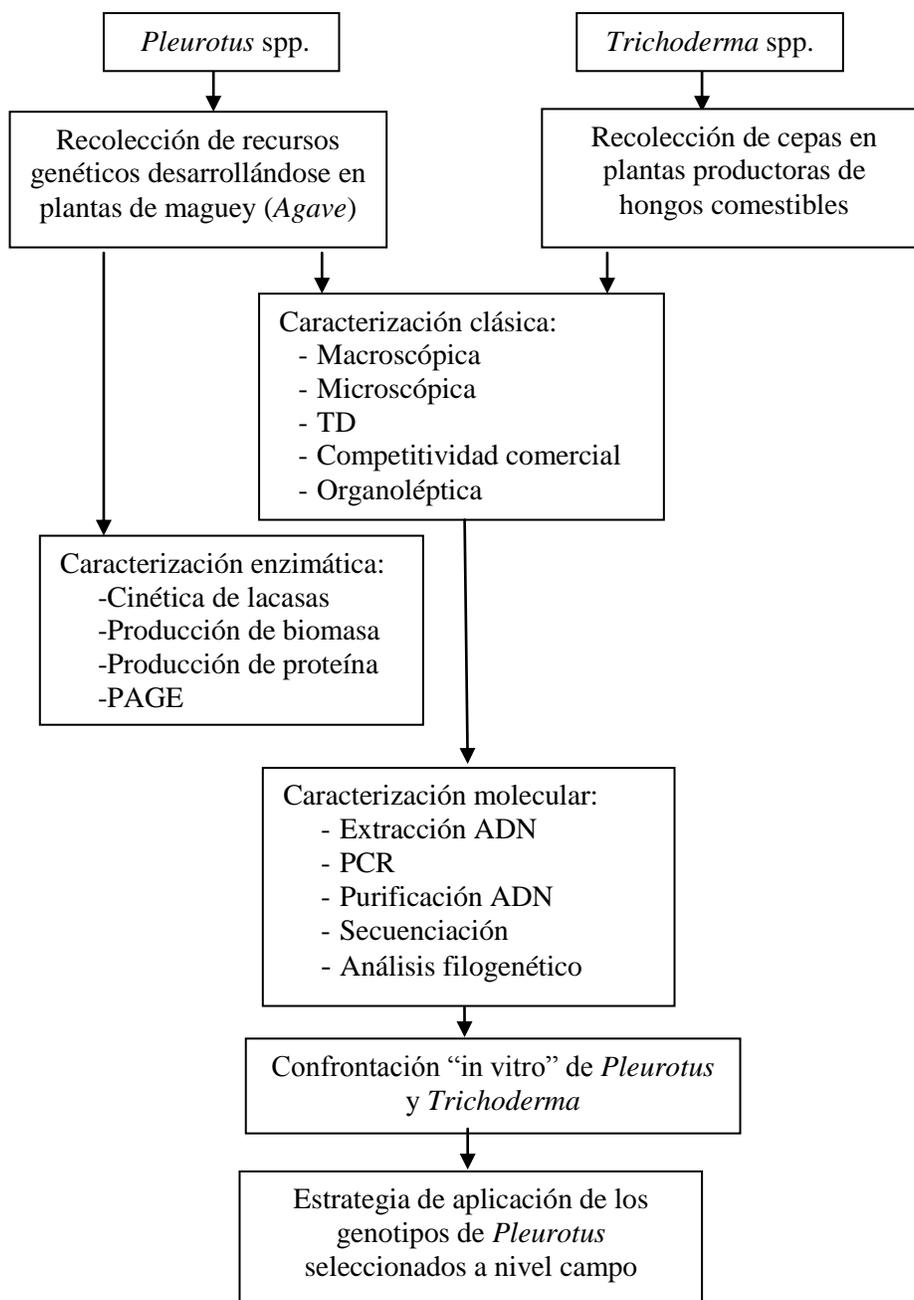


Figura 5.1. Esquema de trabajo realizado para la caracterización y selección de las cepas de *Pleurotus* spp. aisladas de cuerpos fructíferos que crecen sobre el maguey, proporcionadas por el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del COLPOS, *Campus* Puebla.

Para el desarrollo de la presente investigación fue necesario realizar recolecciones de hongos del género *Pleurotus* en la zona centro del país, así como muestras de mohos del género *Trichoderma*, aislados de plantas productoras de hongos comestibles.

5.1 Recolección de recursos genéticos de hongos comestibles y cepas de mohos

Se realizaron salidas de campo a diversas localidades de los Estados de Hidalgo, Morelos, Puebla, y Tlaxcala para recolectar cuerpos fructíferos de *Pleurotus* creciendo sobre la base de las plantas de maguey. Por su parte, para la obtención de muestras de *Trichoderma* contaminando substratos comerciales, se llevaron a cabo visitas a plantas productoras de hongos comestibles en diversos Estados de la República. Todas las cepas aisladas y aquellas de referencia están depositadas en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC) del COLPOS, *Campus* Puebla (**Tabla 5.1**). Las cepas de *Pleurotus* se mantuvieron y resembraron en el laboratorio en medio de agar con extracto de malta (EMA), mientras que las cepas de *Trichoderma* se matuvieron y resembraron en medios de agar con dextrosa y papa (PDA) y completo con extracto de levadura (líquido, CYM). Tanto el EMA como el PDA se prepararon de acuerdo a las instrucciones de la empresa, mientras que la composición del CYM fue (g/L agua destilada): dextrosa, 20; peptona, 2; extracto de levadura, 2; MgSO₄.7H₂O, 0.5; KH₂PO₄, 0.46; K₂HPO₄, 1; y agar, 20. En las **Tablas 5.1** y **5.2** se presenta la lista de cepas estudiadas de *Pleurotus* (24) y *Trichoderma* (14), respectivamente. La investigación incluyó tres cepas de referencia de *P. djamor* y *P. ostreatus* (**Tabla 5.1**).

3.2. Caracterización clásica

3.2.1. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas estudiadas

Se determinaron las principales características macroscópicas de las colonias (color, densidad, textura, micelio aéreo), en los medios de cultivo CYM, EMA y PDA (Difco, E.U.A.) [Sobal *et al.*, 1989]. Por otro lado, se consideró la presencia de fíbulas, dimensión de las fíbulas (largo x ancho), número de fíbulas por campo a 100x (Microscopio Karl-Zeiss), diámetro de las hifas y presencia de estructuras en forma de perilla con pedúnculo.

Tabla 5.1. Cepas de *Pleurotus* sp. aisladas de cuerpos fructíferos que crecían silvestres sobre la base de plantas de maguey, así como las cepas de referencia consideradas en el presente estudio.

Código	Especie	Origen (Estado)	Substrato
Cepas de referencia			
CP-50	<i>P. ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	Comercial	Hibrido mejorado
CP-253	<i>P. djamor</i> (Rumph. : Fr.) Boedijn	Tabasco	Tronco en descomposición
CP-468	<i>P. djamor</i>	Morelos	Tronco en descomposición
Cepas de estudio			
CP-98	<i>P. sp.</i>	Hidalgo	Maguey
CP-194	<i>P. sp.</i>	Tlaxcala	Maguey
CP-358	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-359	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-360	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-361	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-362	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-363	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-364	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-365	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-366	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-373	<i>P. sp.</i>	Morelos	Maguey
CP-375	<i>P. sp.</i>	Morelos	Maguey
CP-376	<i>P. sp.</i>	Morelos	Maguey
CP-424	<i>P. sp.</i>	Morelos	-
CP-425	<i>P. sp.</i>	Morelos	Maguey
CP-426	<i>P. sp.</i>	Morelos	Maguey
CP-460	<i>P. sp.</i>	Guerrero	Maguey
CP-515	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-516	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-517	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-518	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-524	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey
CP-525	<i>P. sp.</i>	Puebla	Maguey

Tabla 5.2. Cepas de *Trichoderma* aisladas de muestras de sustrato contaminado procedente de plantas productoras de hongos comestibles de diversos Estados del país.

Código	Especie	Origen (Estado)	Cultivo asociado
CPM-37	<i>Hypocrea</i> sp.	Puebla	<i>Lentinula edodes</i>
CPM-38	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> Samuels & W. Gams	México	<i>Lentinula edodes</i>
CPM-78	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	Puebla	<i>Lentinula edodes</i>
CPM-103	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Durango	<i>Pleurotus</i>
CPM-108	<i>Trichoderma</i> sp	Puebla	<i>Ganoderma</i>
CPM-109	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-110	<i>Hypocrea</i> sp	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-111	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-112	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-113	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-114	<i>Trichoderma</i> sp	Puebla	<i>Ganoderma</i>
CPM-115	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Guanajuato	<i>Pleurotus</i>
CPM-116	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Donación	-
CPM-117	<i>Trichoderma</i> sp.	Donación	-

5.2.2. Determinación de la tasa de desarrollo (TD)

Esta variable se evaluó determinando el máximo crecimiento lineal promedio de las colonias (mm) cada tercer día en cajas de petri (60 x 15 mm) con los medios de cultivo CYM, EMA y PDA. En todos los casos, se obtuvo el promedio de tres réplicas experimentales (Martínez-Carrera *et al.*, 1986; Sobal *et al.*, 1989).

5.2.4. Evaluación de la competitividad comercial a nivel de módulo experimental

La competitividad comercial de los hongos comestibles se definió en la presente investigación como las características de una cepa que representan valor comercial. Dichas características se evaluaron a partir de la inoculación con las siguientes variables: período para la colonización del sustrato (CS, días), período para la aparición de los primeros primordios de fructificación (APP, días), período para obtener la última cosecha (TUC, días), eficiencia biológica (EB, %) y tasa de producción (TP). La EB se determinó dividiendo el peso húmedo de los cuerpos fructíferos obtenidos entre el peso seco del sustrato empleado al momento de la inoculación, lo cual se expresó en porcentaje (Tschierpe *et al.*, 1977). La TP se evaluó dividiendo la eficiencia biológica entre el período de producción de las cosechas.

Preparación de la “semilla”. Se emplearon granos de trigo estériles (121°C, 1 h) con una humedad aproximada del 65±5%, colocados en frascos de vidrio de boca ancha. La inoculación de los granos se realizó colocando un subcultivo de placa de agar de las cepas estudiadas, bajo condiciones asépticas. Los frascos inoculados se incubaron a 22-25°C hasta la completa colonización de los granos por parte del micelio (Stoller, 1962).

Substrato. La preparación del aserrín suplementado se llevó a cabo de acuerdo a la fórmula COLPOS-17 (C17, Tabla 3.3), la cual se homogenizó y esterilizó a 121°C por 1 h en bolsas de polipropileno con microfiltro (ca. 2.5 kg de sustrato por bolsa; 20 x 50 cm, Unicorn, E.U.A.).

Inoculación del sustrato y fructificación. Las bolsas de polipropileno con aserrín suplementado esterilizadas se inocularon homogéneamente con la “semilla” previamente preparada. Los sustratos inoculados se incubaron a 27.5±0.5°C. Cuando el micelio de las cepas colonizó completamente los sustratos, las bolsas se trasladaron al módulo experimental para su fructificación en condiciones apropiadas de humedad (75±5%), temperatura (27±1°C), luz diurna indirecta, y aeración (extracción de aire por 1 h, cada ca. 8 h). Se realizaron 4-5 réplicas experimentales.

Tabla 5.3. Composición de la fórmula COLPOS 17 y sus proporciones en peso seco.

Componentes	Peso de la materia prima (g)
1. Bagazo de caña (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	29.9
2. Salvado de trigo comercial	69.3
3. Aserrín encino (<i>Quercus acutifolia</i> Neé)	149.9
4. Aserrín <i>Bursera</i> (<i>B. simaruba</i> (L.) Sarg.	28.7
5. Olote de maíz (<i>Zea mays</i> L.)	63.4
6. Ca (OH) ₂	10.5
7. CaSO ₄	42.0
Total peso seco	393.7
8. H ₂ O (ml)	606.3
Total (peso húmedo)	1,000.0
Peso húmedo de la unidad de producción (UP, g)	2,500.0

5.2.5. Características organolépticas

5.2.5.1. Prueba preliminar de las características organolépticas

Un aspecto importante para poder introducir nuevas cepas al mercado de la producción de hongos comestibles son las características organolépticas. Por tal motivo se realizó una caracterización del sabor y consistencia a los cuerpos fructíferos producidos. Los hongos se cocinaron únicamente con aceite de maíz (Mazola) y sal, para evitar al máximo interferencias de otros sabores, así como percibir mejor sus características. Se estableció una escala de 5 puntos para especificar el sabor, y otra escala de 7 puntos para determinar la consistencia de las muestras de hongos (**Tabla 5.4**).

Tabla 5.4. Escalas de sabor y consistencia definidas en este estudio para determinar las características organolépticas de los cuerpos fructíferos cocinados de las cepas estudiadas de *Pleurotus*.

No.	Escala de sabor*:	No.	Escala de consistencia:
0	Insípido	0	Muy suave
1	Sabor poco intenso (ligero)	1	Suave
2	Agradable (moderado)	2	Firme suave
3	Sabroso (intenso)	3	Firme, similar a la “carne”
4	Delicioso (muy intenso)	4	Ligeramente coriácea
		5	Coriácea
		6	Muy coriácea

* = Evaluación adaptada a la escala de Anzaldúa (2005).

5.2.5.2. Prueba grupal de las características organolépticas (exploratoria de las preferencias)

Para estimar el impacto de las cepas de *Pleurotus*, correspondientes a los “Hongos del Maguey” se realizaron dos evaluaciones:

1) Preferencia de compra: se solicitó a los encuestados que registraran el orden de preferencia de compra por aspecto (de mayor a menor grado) de hongos frescos representativos de cada cepa (**Figura 5.2**).

2) Degustación de los hongos: Para la evaluación exploratoria de las características de olor, sabor y consistencia con el consumidor, se utilizó una escala de 9 categorías, de acuerdo con Anzaldúa (2005) [**Tabla 5.5**]. Se eligieron al azar 16 jueces consumidores (9 mujeres y 7

hombres). Sólo se evaluaron fueron las cepas CP-363, CP-425, CP-426 y CP-460), tomando como referencia dos cepas comerciales (CP-50 y Monte Rey). Esta prueba se consideró como exploratoria de las preferencias de los consumidores, ya que el número de participantes fue bajo (Ellis, 1961; ASTM, 1968).

Tabla 5.5. Escala de sabor y consistencia definida en este estudio para determinar las características organolépticas de los cuerpos fructíferos cocinados de las cepas estudiadas de *Pleurotus*.

No.	Escala de olor/sabor/consistencia*:
1	Me gusta muchísimo
2	Me gusta mucho
3	Me gusta
4	Me gusta moderadamente
5	Indiferente
6	Me disgusta moderadamente
7	Me disgusta
8	Me disgusta mucho
9	Me disgusta muchísimo

* = Evaluación adaptada a la escala de Anzaldúa (2005).

5.3. Caracterización enzimática

5.3.1. Evaluación de la producción de lacasas por *Pleurotus*

La metodología para la determinación de lacasas, proteína, biomasa y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se definió durante la estancia de la alumna en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el laboratorio del Dr. Leobardo Serrano Carreón (Bourbonnais & Paice, 1990; Vidal, 2007; Casasanero-Orduña, 2008; Flores *et al.* 2009; Flores *et al.* 2010). Dicha metodología se describe a continuación.

5.3.1.1. Preparación de materiales y medio líquido

El extracto de malta líquido (EML) se preparó pesando 10 g de malta comercial en el vaso de precipitado y agregando 500 ml de agua destilada, se agitó en parrilla ((Corning, E.U.A., velocidad 3). El EML se ajustó a pH= 6.0 con ácido fosfórico al 50% y NaOH 0.4 M. El medio de cultivo (90 ml) se distribuyó en matraces Erlenmeyer (500 ml), cubriéndolos con tapones SIMAX y papel aluminio, para esterilizarlos a 121°C durante 20 min. Paralelamente, se

esterilizaron el vaso de acero inoxidable (80 ml, Tipo BOSCH, Modelo 0601608034) y una probeta de 10 ml, cubriéndolos con papel aluminio.

5.3.1.2. Inoculación del medio líquido

Se cortó placa de agar con micelio (1 cm²) a partir de una caja de petri en pleno crecimiento fúngico sobre medio de cultivo Agar-Malta (AM: agar bacteriológico + 2% de malta comercial, Droguería Cosmopolita). Diez fragmentos de dicho inóculo (1 cm²) se colocaron asépticamente al vaso de acero inoxidable estéril con *ca.* 30 ml de EML y se homogenizaron a 30,000 rpm durante 10 s. El rotor del homogenizador se lavó con *ca.* 20 ml de EML y se transvasó (*ca.* 10 ml) a la probeta estéril para inocular cada matraz de Erlenmeyer que contenía 90 ml de EML. Los matraces inoculados (100 ml en total) se incubaron en agitación (150 rpm) a 25°C durante 4 días (New Brunswick Scientific, E.U.A.).

5.3.1.3. Obtención del inóculo

El *pellet* micelial desarrollado en el medio EML de los matraces incubados se transvasó a tubos de teflón, los cuales se centrifugaron a 11,000 rpm durante 15 min (centrífuga Beckman, Modelo J2-21). Se eliminó con pipeta el sobrenadante y la biomasa micelial se resuspendió con *ca.* 12.5 ml de solución salina 0.9% (J. T. Baker, E.U.A.) mediante agitación en vortex (30-60s). El contenido resuspendido se transvasó a tubos Falcon (15 ml, Corving), los cuales se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min. Se eliminó con pipeta el sobrenadante y la biomasa micelial se resuspendió nuevamente con *ca.* 14 ml de solución salina 0.9% (J. T. Baker, E.U.A.) mediante agitación en vortex (1 min). El contenido resuspendido se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min. Se eliminó con pipeta el sobrenadante y la biomasa micelial (equivalente a *ca.* 3.5 ml) se resuspendió con agua destilada estéril (3x: 10.5 ml) mediante agitación en vortex (1 min). El contenido resuspendido en agua de 4 tubos Falcon se transvasó a un vaso de acero inoxidable estéril (80 ml), se homogeneizó a 30,000 rpm durante 10 s, y se vertió a un matraz de Erlenmeyer (250 ml) estéril. Este matraz se agitó manualmente y se tomó 1 ml para inocular los matraces experimentales con 100 ml de EML estéril.

5.3.1.4. Incubación y extracción de la enzima lacasa

Los 14 matraces de Erlenmeyer inoculados se incubaron en agitación a 25°C y 150 rpm. La cinética de producción de lacasa se evaluó a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, y 144 h. Se transvasaron muestras de 12 ml durante los períodos de estudio, pasándolas a tubos Falcon estériles, los cuales se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 min (centrífuga Eppendorf). Se recuperó el sobrenadante y distribuyó en dos tubos Eppendorf (2 ml), guardando el restante en un tubo Falcon (15 ml), los cuales se almacenaron a 4°C.

5.3.1.5. Preparación de reactivos

Buffer de Acetatos 0.1 mM, pH= 5. Se prepararon 500 ml de acetato de sodio 0.1 M ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; PM: 136.08, J. T. Baker, E.U.A.), pesando 6.805 g y se disolviéndolo en 500 ml de agua destilada. Por otra parte, se prepararon 200 ml de una solución de ácido acético 0.1 mM (CH_3COOH ; PM: 60.05), para ajustar el pH de la solución acetato de sodio 0.1 M a 5. Se midió 1.144 ml de ácido acético, y disolvió en 200 ml de agua destilada. Esta solución se añade a los 500 ml de acetato de sodio 0.1 M, y titula hasta un pH de 5.

Substratos (para 2 cepas, en cinética enzimática y geles). El DMP 6 mM (2, 6-dimetoxifenol; PM=154.17; lectura espectrofotométrica: 468 nm) se preparó pesando 0.07 g de DMP (Sigma-Aldrich) en un tubo Eppendorf, se predisolvió en etanol, y se transvasó a una probeta para aforar a 70 ml de etanol (J. T. Baker, E.U.A.). La Siringaldazina (SYR) 0.1 mM (PM= 360.37; lectura espectrofotométrica: 526 nm) se preparó pesando 0.0018 g de siringaldazina (Sigma-Aldrich) en un tubo Eppendorf, se predisolvió en etanol, y se transvasó a una probeta para aforar a 50 ml de metanol (J. T. Baker, E.U.A.). El ABTS 1 mM (sal de diamonio del ácido 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6 sulfónico); PM= 548.7; lectura espectrofotométrica: 436 nm) se preparó pesando 0.03843 g de ABTS (Sigma-Aldrich) en un tubo Eppendorf, se predisolvió en etanol, y se transvasó a una probeta para aforar a 70 ml de etanol. Finalmente, el Guaiacol (GY; Sigma-Aldrich) 60 mM (2-metoxifenol; PM= 124.14; lectura espectrofotométrica: 450 nm) se preparó pesando 0.223 ml de guaiacol, y aforando a 30 ml de etanol. Las especificaciones de cada substrato se resumen en la **Tabla 5.6**.

Tabla 5.6. Substratos empleados para la determinación de lacasas, considerando concentración, peso molecular, solvente y longitud de onda para su lectura en el espectrofotómetro.

Substrato	C	Nombre	Característica	PM	λ (nm)	Cantidad	Solvente
DMP	6.0 mM	2, 6-dimetoxifenol	Cristales cafés	154.17	468	0.07 g	70 ml etanol
Siringaldazina	0.1 mM	-	Polvo amarillo	360.37	526	0.0018 g	50 ml metanol
ABTS	1.0 mM	Sal diamónica del ácido 2, 2'-Azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6 sulfónico)	Cristales transparentes	548.7	436	0.03843 g	70 ml etanol
Guaiacol	60.0 mM	2-metoxifenol	Polvo amarillo	124.14	465	0.223 ml	30 ml etanol

C= Concentración.

5.3.1.6. Determinación espectrofotométrica de la lacasa

Se realizó de acuerdo a la técnica Bourbonais & Paice (1990). La espectrofotometría o espectroscopía es un método analítico que mide la cantidad de luz que es absorbida o transmitida por una sustancia en solución. Es una técnica muy valiosa para la determinación de sustancias. Todas las sustancias en solución absorben luz de ciertas longitudes de onda y transmiten luz de otras longitudes. Por lo tanto, la absorbancia es una característica de cada sustancia, como lo son el punto de fusión, el punto de ebullición, la densidad y la solubilidad. Dado que la absorción se relaciona con la cantidad de sustancia en solución, puede utilizarse para la determinación cuantitativa de la concentración de una sustancia en la solución (González-Morán, 1996).

Las lecturas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Lambda EZ 201). Las mezclas de reacción utilizadas para evaluar la concentración enzimática se especifican en la **Tabla 5.7**, mientras que las cantidades empleadas para las cepas CP-50, CP-253 y CP460 se muestran en las **Tablas 5.8-5.9**

Tabla 5.7. Relación de los componentes de la mezcla de reacción utilizados para evaluar la concentración enzimática en el espectrofotómetro, considerando el blanco y la muestra.

Orden	Componente	Celda 1	Celda 2
		Blanco	Muestra
1°	Buffer de acetatos, pH= 5	Misma cantidad que en la mezcla de la muestra	Depende de la muestra y el substrato empleado
2°	Substrato (DMP, SYR, ABTS, GY)	200 µl	200 µl
3 ^a	Malta al 2% medio líq.	Misma cantidad que la muestra	-
3 ^b	Muestra: sobrenadante con la enzima (0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h)	-	Depende de la absorbancia*

DMP= 2, 6-dimetoxifenol. SYR= Siringaldazina, ABTS= Sal diamónica del ácido 2, 2'-Azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6 sulfónico), GY= Guaiacol,

*= Si la absorbancia es < 0.01, se debe incrementar la muestra, mientras que si su valor es > 1.0 deberá disminuirse la muestra.

Tabla 5.8. Componentes de la mezcla de reacción utilizados para determinar la concentración enzimática en las muestras de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, dependiendo del substrato.

Substrato	Componente (ml)	Tiempo (h)						
		0	24	48	72	96	120	144
DMP	Buffer	1.750	1.750	1.780	1.780	1.780	1.750	1.700
	Substrato	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
	Muestra	0.050	0.050	0.020	0.020	0.020	0.050	100 µl
SYR	Buffer	1.600	1.600	1.750	1.750	1.750	1.750	1.750
	Substrato	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
	Muestra	0.200	0.200	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
ABTS	Buffer	1.600						
	Substrato	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
	Muestra	0.200						
GY	Buffer	1.600						
	Substrato	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
	Muestra	0.200						

Tabla 5.9. Componentes de la mezcla de reacción utilizados para evaluar la concentración enzimática en las muestras de las cepas CP-253 y CP-460 de *Pleurotus djamor* y *P. sp.*, respectivamente, dependiendo del sustrato.

Substrato	Componente (ml)	Tiempo (h)						
		0	24	48	72	96	120	144
DMP	Buffer	1.600						
	Substrato	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
	Muestra	0.200						
SYR	Buffer	1.600						
	Substrato	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
	Muestra	0.200						
ABTS	Buffer	1.600						
	Substrato	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
	Muestra	0.200						
GY	Buffer	1.600						
	Substrato	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
	Muestra	0.200						

Al realizar la determinación espectrofotométrica de lacasas se tomaron en consideración las siguientes recomendaciones: 1) El volumen de reacción debe mantenerse constante en 2 ml; 2) La mezcla de reacción debe llevarse a cabo en el siguiente orden: buffer + sustrato + muestra; 3) La cantidad de sustrato debe ser constante (200 µl); 4) Primero debe calibrarse el espectrofotómetro en cero con el blanco; 5) En la celda de la muestra, al adicionarla se tapa con parafilm y se agita manualmente, para introducirse al espectrofotómetro inmediatamente; 6) Las lecturas de absorbancia se realizan en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 min, para generar la pendiente; y 7) Los residuos de las determinaciones enzimáticas se almacenan en frascos y, posteriormente, se entregan a empresas especializadas para su disposición.

5.3.1.7. Determinación de la actividad volumétrica

La actividad volumétrica se expresó en U/ml, lo cual corresponde a la cantidad de unidades enzimáticas que se encuentran reaccionando con el sustrato por mililitro del medio. Dicha actividad se obtiene de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Volumétrica} = \frac{m}{(\epsilon) (l)}$$

donde:

m= Pendiente (obtenida de las lecturas de absorbancia por minuto).

ϵ = Coeficiente de extinción molar (de cada sustrato).

l= Ancho de la celda (1 cm o equivalente).

Los coeficientes de extinción molar de los sustratos utilizados son los siguientes:

DMP: 27,500 (Téllez-Téllez *et al.*, 2005); Siringaldazina: 65,000 (Leonowicz & Grzywnowicz, 1981); ABTS: 29,300 (Niku-Paavola *et al.*, 1988.); Guaiacol: 26,600 (Vidal, 2007).

El coeficiente de extinción se determina realizando una serie de diluciones de la sustancia de interés. Luego se mide la absorbancia de cada muestra de dilución a una longitud de onda determinada. Los valores de absorbancia son graficados en función de la concentración. El resultado debe ser una línea recta. La pendiente de la línea ($\Delta y/\Delta x$) es el coeficiente de extinción (K). Si las unidades de concentración se expresan en moles, entonces la constante se llama coeficiente de extinción molar y se mide en unidades $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La pendiente se obtiene de los datos de absorbancia de cada minuto en que transcurría la reacción (0- 6 min) con el sustrato. En este caso, no fue necesario obtenerla, ya que el equipo del espectrofotómetro proporcionaba automáticamente el dato.

En virtud de que la fórmula de actividad volumétrica (AV) expresa el resultado M/min, es necesario dividir el producto entre 1×10^{-6} para obtener la cantidad AV en $\mu\text{M}/\text{min}$. Esta AV se divide entre el volumen de la muestra (0.02-0.200 ml) para obtener las unidades enzimáticas por mililitro (U/ml). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μM de sustrato por minuto, por mililitro.

5.3.2. Determinación de biomasa

El contenido (biomasa micelial + EML) de los matraces experimentales se virtió en papel filtro (esterilizado, secado a 80°C, y prepesado), ajustado a un embudo en matraz de Kitazato y se

aplicó vacío. La biomasa micelial obtenida sobre el papel filtro se pesó, se secó a 80°C, y se pesó nuevamente a las 24 h de secado.

5.3.3. Determinación de la producción de proteína extracelular

Debido a que las lacasas son glicoproteínas, al determinar la proteína extracelular en medio líquido, se puede tener una correlación entre la enzima lacasa y la proteína total. La producción de proteína por los hongos comestibles estudiados se determinó de acuerdo con la técnica de Bradford (1976), empleando suero de albúmina bovina como estándar (*Bio-Rad protein assay*, E.U.A.). Para ello fue necesario desarrollar una curva de calibración con una solución *stock* de concentración conocida de albúmina bovina, con el objetivo de tener valores de referencia para evaluar las muestras bajo investigación. La solución *stock* (1 mg/ml) se preparó pesando 2 mg de albúmina bovina, y aforando a 2 ml con agua bidestilada MQ (miliQ). A partir de esta solución “stock” se prepararon 6 diluciones de concentración conocida, de acuerdo con la **Tabla 5.10**.

Tabla 5.10. Concentración de las soluciones estándar de albúmina bovina.

Concentración de solución estándar (mg/ml)	Solución Stock [1 mg/ml] (ml)	H ₂ O MQ (ml)
0.002	0.004	1.996
0.006	0.012	1.988
0.010	0.020	1.980
0.014	0.028	1.972
0.018	0.036	1.964
0.022	0.044	1.956

La concentración de la solución estándar a partir del *stock* (1 mg/ml) se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

donde:

C_1 = Concentración de la solución *stock* (1 mg/ml).

V_1 = Volumen de la solución *stock* que se eligió de forma arbitraria (segunda columna de la **Tabla 5.10**) para preparar el estándar correspondiente.

C_2 = Concentración de la solución estándar, que se desconoce.

V_2 = Volumen final que se desea de la solución estándar (se prepararon 2 ml).

Se despeja C_2 , obteniéndose: $C_2=C_1V_1/V_2$ (primera columna, **Tabla 5.10**).

La tercera columna de la **Tabla 5.10** se genera al aforar el volumen final de 2 ml.

Para determinar la concentración de proteína en el espectrofotómetro se empleó el colorante azul de Coomassie (*Bio-Rad Protein Assay, dye reagent concentrate 500-0006*), el cual reaccionó con la proteína presente. Fue necesario preparar un blanco, así como las soluciones estándar con el colorante (por duplicado), de acuerdo a la **Tabla 5.11**. Después de 30 min se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda (λ)= 595 nm, para generar la curva de calibración.

Tabla 5.11. Componentes necesarios para preparar las mezclas de reacción de los estándares y el blanco que determinarán espectrofotométricamente la curva de calibración de proteína ($\lambda= 595$ nm).

Componente	Blanco + colorante	Estándar + colorante
H ₂ O MQ (ml)	0.800	-
Estándar correspondiente (0.002, 0.006, 0.010, 0.014, 0.018, 0.022 mg/ml) [ml]	-	0.800
Colorante Azul de Coomassie (ml)	0.200	0.200
Volumen total (ml)	1.000	1.000

Se procedió a tomar las lecturas en el espectrofotómetro de las mezclas de reacción preparadas a una longitud de onda (λ)= 595 nm. El promedio de la absorbancia (duplicado) se graficó en el programa Excel, para generar una línea de tendencia con su ecuación y valor de r^2 . Posteriormente, se despejó el valor de “x” para obtener la concentración de proteína de las muestras, quedando de la siguiente manera:

$$y = mx + b$$

donde:

y= Absorbancia (valor que proporciona el espectrofotómetro).

m= pendiente (valor que da la ecuación de Excel)

x= concentración de proteína (mg/ml) (valor deseado)

b= Intersección con “y” (valor que da la ecuación de Excel)

Al despejar:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Antes de realizar la lectura de las muestras en el espectrofotómetro, se realizó una dilución de las muestras para evitar que los valores de absorbancia sobrepasen 1, y para generar más muestra. Por ejemplo, 0.500 ml de la muestra + 0.500 ml H₂O MQ = Dilución 1:2 de la muestra. Esta dilución se utilizó para preparar la mezcla de reacción, de acuerdo con la **Tabla 5.12**. Para el caso de las muestras de provenientes de los co-cultivos y controles en medio sólido se realizó una dilución 1:3.

Tabla 5.12. Componentes necesarios para preparar las mezclas de reacción de los estándares, el blanco y de las muestras para determinar espectrofotométricamente la concentración de proteína de las muestras ($\lambda = 595$ nm).

Componente	Blanco + colorante	Estándar + colorante	Muestra + colorante
H ₂ O MQ (ml)	0.800	-	-
Estándar (mg/ml) [ml]	-	0.800	-
Muestra (sobrenadante diluido 1:2)	-	-	0.800
Colorante Azul de Coomassie (ml)	0.200	0.200	0.200
Volumen total (ml)	1.000	1.000	1.000

Finalmente, para obtener la concentración de proteína de las muestras, se despejó “x” de la ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$x = \frac{\text{Absorbancia} - b}{m} \times 2 \text{ (factor de dilución, de 1:2)}$$

5.3.4. Determinación de la actividad enzimática de lacasas en medio de agar al confrontar *Pleurotus* y *Trichoderma aggressivum* (PAGE)

Se obtuvo la tasa de desarrollo por separado de cada una de las cepas estudiadas, para precisar las condiciones de co-cultivo en caja de petri. Posteriormente, se desarrollaron por triplicado en caja de petri con EMA, los siguientes tratamientos: control *Pleurotus ostreatus* (CP-50), control *Trichoderma aggressivum* (CPM-64), y el co-cultivo CP-50 x CPM-64. Para evaluar la producción de lacasa en función de la interacción basidiomicete-*Trichoderma*, Los co-cultivos se incubaron hasta lograr una longitud de contacto entre las colonias 5.0 ± 0.5 cm. El área de interacción se cortó con un molde de aluminio (8 x 1.5 cm), y se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml, al cual se le adicionaron 4 ml de buffer de acetatos 0.1 mM, pH= 5. La suspensión se agitó en el Vortex (Thermolyne, E.U.A.) por 8 min al nivel de agitación máxima. El contenido se transfirió nuevamente a tubos Falcon de 15 ml, y se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min (Centrífuga Eppendorf 5804). El sobrenadante se vertió en tubos Eppendorf (2 ml). La determinación de lacasas al espectrofotómetro se realizó con los substratos DMP, SYR y ABTS, siguiendo la técnica descrita previamente (**Tabla 5.9**).

5.3.5. Electroforesis de lacasas producidas por *Pleurotus*

5.3.5.1. Preparación de los geles

Se preparó primero el gel separador de acrilamida al 10%, en el cual se separaron las proteínas de acuerdo con su peso molecular. Los componentes se colocaron en un tubo Falcon siguiendo el orden indicado en la **Tabla 5.13**. Se tuvo especial cuidado al agregar el último ingrediente, ya que la mezcla se polimeriza con rapidez; por tal motivo, debe homogeneizarse inmediatamente después de agregar el TEMED (Bio-Rad, E.U.A.). El TEMED se empleó puro, y con una micropipeta se tomaron 3.3 ml de la mezcla del gel separador preparado, depositándolos entre las placas de cristal del equipo de electroforesis vertical (Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cells, E.U.A.) y agregando agua MQ para emparejar el llenado del gel. Es importante usar guantes, para evitar el contacto con los reactivos.

Tabla 5.13. Componentes necesarios para la preparación de geles de acrilamida: gel separador y gel concentrador.

Componente	Tipo de gel de acrilamida			
	Separador (10%)		Concentrador (5%)	
	(ml)	(μ l)*	(ml)	(μ l)*
Acrilamida 40% (<i>Bio-Rad</i> , No. Cat. 161-0144)	1.74	1,740	0.30	300
Buffer TRIS 1.5 M, pH=8.8	1.68	1,680	---	---
Buffer TRIS 0.5 M, pH=6.8	---	---	0.80	800
H ₂ O destilada	3.438	3,438	1.391	1,391
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.060	60	0.0146	14.6
TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina)	0.006	6	0.0029	2.9
Cantidad necesaria de cada gel	3.3		0.8	

Persulfato de amonio (APS) 10% (*Sigma*, No. A-3678). Acrilamida 40% (*Bio-Rad*, No. 161-0144).

Ver **Anexo B** para preparación de reactivos.

Después de *ca.* 5 min, se retiró el agua para agregar en la parte superior el gel concentrador, el cual se preparó de acuerdo a la **Tabla 5.13**. De igual forma que en el gel separador, se tuvo cuidado al agregar el TEMED, para homogeneizarlo inmediatamente, y se vertió entre las placas de cristal la cantidad de 0.8 ml del gel concentrador. Posteriormente, se colocó el peine para establecer los pozos. Una vez solidificados los geles, pueden utilizarse directamente o almacenarse con las placas de vidrio en buffer de corrida a 4°C. El gel preparado se colocó en el aparato para el corrimiento electroforético, y se depositaron en los pozos 15 μ l de las muestras preparadas y la lacasa comercial. El gel se introdujo al equipo, en la cámara de corrimiento, para agregar el buffer de corrida no desnaturizante (introducir completamente para que cubra los electrodos). El equipo se tapó y se conectó a la corriente (*PowerPac Basic Power Supply*, Bio-Rad, no. 164-5050).

5.3.5.2. Preparación de las muestras

Concentrado. Las muestras de estudio se tomaron de experimento previo (ver 5.3.3. Determinación de la producción de proteína extracelular). En tubos Eppendorf se colocó la muestra a concentrar, de acuerdo a la cantidad de proteína que tuviera, haciendo un ajuste para

que el concentrado tuviera una concentración de proteína de 200 µg/ml. Las muestras se concentraron introduciéndolas en una centrifuga de vacío (Eppendorf AG, Mod. 22331), cuyo procedimiento puede durar hasta 8 h para las de mayor volumen. Después de la concentración se retiraron y se introdujeron al congelador.

Muestras preparadas. A un tubo Eppendorf (1 ml), se le agregaron 15 µl de la muestra concentrada, y 7 µl buffer de carga no desnaturizante (Tris 0.5 M, pH 6.8).

Preparación de la lacasa comercial. Se pesaron 10 µg de lacasa comercial + 1 ml de agua destilada + 2 µl de glicerol.

La cantidad de corriente adecuada dependió del geles, de 15-25 mA. El proceso de corrimiento de 2 geles tomó aproximadamente 2:30 h. Cuando se observó que las muestras corrieron hasta el final, se retiraron del equipo, de las placas de cristal, y se depositaron dentro de unas tapas de caja de petri (20 mm de diámetro) que se colocaron en una placa agitadora (*Dusher Technology*, E.U.A.). La actividad enzimática se reveló agregando 50 ml de buffer de acetatos, pH= 5, y se adicionaron 15 ml de ABTS. A los 22 min se sacó el gel y se pasó a buffer de acetatos limpio, momento en que comenzaron a observarse las bandas de corrimiento color verde, las cuales se fotografiaron. Nuevamente, se sacaron y se pusieron en 50 ml de buffer limpio. Luego se cambió el buffer (50 ml), y se agregaron 15 ml de siringaldazina, repitiendo la operación anterior, es decir, se pasó a buffer limpio, y se observaron bandas rosas. Se adicionó buffer de acetatos para desteñir. En seguida, se adicionaron a la caja de petri 50 ml de buffer de acetatos + 15 ml de guayacol, se pasó a buffer limpio y se observaron bandas cafés en esta ocasión. Se pasó a buffer limpio para desteñir. Se agregaron 50 ml buffer de acetatos + 15 ml de DMP, se pasó a buffer limpio observándose bandas cafés.

5.4. Caracterización molecular

5.4.1. Análisis a nivel molecular de la región ITS del ADNr de las cepas de *Pleurotus*

La metodología de estudio se realizó de acuerdo con Martínez-Carrera (1995).

5.4.1.1. Cultivo de las cepas en medio líquido y cosecha del micelio

Las cepas de *Pleurotus* estudiadas se desarrollaron en cajas de petri con medio completo líquido con extracto de levadura (CYM, dextrosa, 20 g; peptona, 2 g; extracto de levadura, 2 g; MgSO₄.7

H₂O, 0.5 g; KH₂PO₄, 0.46 g; K₂HPO₄, 1 g; agua destilada: 1,000 ml), incubadas a 25°C. El micelio de cada cepa fue cosechado empleando una espátula estéril, eliminando el exceso de humedad, presionando y secando el micelio entre dos segmentos de papel filtro (Whatman). El micelio se introdujo en tubos Eppendorf (1.5 ml), los cuales se cerraron y colocaron vapor de nitrógeno líquido (N₂, -130°C) por 20 min, para posteriormente almacenarse a -24°C o se liofilizaron inmediatamente (Labconco, E.U.A.).

En el caso de *Trichoderma*, las cepas estudiadas se cultivaron en matraces de Erlenmeyer con 50 ml de medio líquido CYM, en agitación (150 rpm) a una temperatura de 27±2°C, por un período de 72-120 h dependiendo de la cepa. Para cosechar el micelio, el contenido de los matraces se vertió sobre un papel filtro estéril, el cual fue depositado dentro de un embudo Büchner, fijado a un matraz Kitazato con sistema de vacío para extraer la mayor parte del medio líquido.



Figura 5.2. Proceso de cosecha del micelio de *Trichoderma* para estudios moleculares.

5.4.1.2. Liofilización del micelio

Los tubos Eppendorf con el micelio congelado se liofilizaron durante 24 h empleando un liofilizador (Labconco, Freezone 4.5, E.U.A.). Las muestras liofilizadas fueron empleadas para la extracción de ADN, o almacenadas en un desecador.

5.4.1.3. Extracción del ADN

La extracción del ADN genómico se realizó de acuerdo con la técnica de Challen *et al.* (1995). Se homogenizó la muestra moliendo el micelio liofilizado en el tubo Eppendorf con una asa de

plástico estéril (gamma irradiada). Se le agregaron 650 µl de Buffer A (2 ml KCl 4 M; 2 ml EDTA 0.5 M pH 8.0; 1 ml Tritón 20%; 9 ml agua destilada) para favorecer la lisis celular, añadiendo 5 µl de ARNasa (10 mg/ml, Qiagen) para evitar la interferencia del ARN. Se agitó en el vortex y se incubó a 70°C por 30 min para acelerar la reacción. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min, con el fin de eliminar los restos celulares. El sobrenadante se depositó en una columna Qiagen tip 20 (QIAGEN Plasmid Mini Kit), pre-equilibrada con 1 ml de Buffer QBT. Después, la columna fue lavada cuatro veces con 1 ml de Buffer QC, y el ADN fue eluído con 700 µl de Buffer QF para recuperarse en un tubo de microcentrífuga. El ADN se precipitó con 700 µl de isopropanol, mezclándolo por inversión, dejando reposar 2 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min, y se retiró el sobrenadante. El exceso de sales del *pellet* de ADN obtenido se eliminó con 500 µl de etanol al 70%, mezclando por inversión. Se volvió a centrifugar a 13,000 rpm por 10 min, y se eliminó el sobrenadante, retirando la mitad del solvente con una micropipeta, y el resto se eliminó volteando rápidamente el tubo sobre un papel absorbente. El resto del solvente se volatilizó colocando el tubo en el horno a 55°C durante 30 min. Finalmente, el *pellet* seco se resuspendió en 50 µl de buffer Tris EDTA pH 8.0 (TE 1x) en baño María a 55°C durante 30 min. La calidad y cantidad del ADN se determinó por el método de Sambrook *et al.* (1989), por electroforesis en gel de agarosa (1.5%), con tinción de bromuro de etidio.

5.4.1.4. Calidad y cantidad del ADN extraído

Para preparar el gel de agarosa al 1.5 % (1.5 g de agarosa ultrapura, 100 ml de Buffer TAE 1% 1x, preparado con 980 ml agua destilada estéril más 20 ml TAE 50x). En un matraz (250 ml) se vertió la agarosa y el buffer TAE 1x. Se calentó por 1 min en el microondas moviendo y mezclando de manera homogénea. Posteriormente, se agregaron 3 µl de bromuro de etidio, y se agitó para homogenizar y vertir en el aparato electroforético. Ya solidificado, se retiró el peine cuidadosamente y se agregó el buffer TAE 1x a la cámara electroforética hasta cubrir el gel. Las muestras de ADN se prepararon de acuerdo a la mezcla de reacción de la **Tabla 5.14**.

Tabla 5.14. Componentes de la mezcla de reacción para realizar el corrimiento electroforético de las muestras de ADN extraído.

Componentes de la mezcla	Volumen (μL)
Buffer TE 1x (BTE 1x)	6.0
Buffer de carga (BC)	3.0
Muestras de ADN	1.0

Los marcadores (λ -DNA 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Roche, E.U.A.) se depositaron sobre los pozos, como referencia en el corrimiento electroforético de los volúmenes de λ -DNA 10 ng, 1.0 μl ; 25 ng, 2.5 μl ; y 50 ng, 5.0 μl . El corrimiento se desarrollo a 75 volts/5 min, y 50 volts/3:15 h. Posteriormente, el gel se colocó en un transiluminador Geldoc (Bio-Rad, E.U.A.) para cuantificarse con el programa *Quantity One Software*.

5.4.1.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la región ITS del ADNr

Las concentraciones de ADN se ajustaron a 50 ng en todas las muestras. Las reacciones de amplificación (50 μl) se llevaron a cabo con un *AmpliTaq Gold PCR kit* (Applied Biosystems, E.U.A.), cuya composición se muestra en la **Tabla 5.15**. La región ITS1-5.8S-ITS2 se amplificó empleando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [White *et al.*, 1990].

Tabla 5.15. Componentes de la mezcla de reacción para realizar la amplificación de la región ITS del ADNr mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Componente	Volumen (μl)
Mezcla maestra (<i>Master mix</i>)	25
Agua de PCR	10-14
Iniciador ITS-1 (10 μM)	5
Iniciador ITS-4 (10 μM)	5
Muestra de DNA (50 ng)	1-5
Volumen total de reacción	50

Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en el termociclador (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems), siguiendo un protocolo de un ciclo inicial (95°C/1 min),

seguido de 25 ciclos adicionales (94°C/30 s; 50°C/45 s; 72°C/5 min), y un ciclo final (72°C/5 min). Los productos de amplificación se almacenaron a -24°C, y se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) con bromuro de etidio.

5.4.1.6. Purificación y secuenciación de los productos de PCR

Se siguió el protocolo del kit de purificación de PCR de QIAquick (QIAGEN, Alemania). Se tomó el producto de PCR (ca. 46 µl), y se añadió 5 veces su volumen de buffer PB (230 µl), mezclando por inversión de 5 a 10 veces. Posteriormente, se transfirió la mezcla (ca. 276 µl) a columnas (QIAquick Spin 50) rotuladas. Se centrifugaron a 13,000 rpm/2 min, y se desechó el líquido centrifugado del tubo colector, el cual se volvió a unir a la columna. Se añadieron 700 µl de buffer PE a las columnas para lavar las muestras, y se centrifugaron a 13,000 rpm/2 min. Se desechó el líquido centrifugado del tubo colector, para volver a centrifugar a 13,000 rpm/2 min. Posteriormente, se retiró el tubo colector, y en su lugar se colocó un tubo Eppendorf (1.5 ml). Luego se le añadieron 30 µl de agua de PCR al centro de la membrana de la columna, se cerró la columna y se centrifugó a 13,000 rpm/2 min. Se retiró la columna y, finalmente, el tubo que contiene el producto de ADN puro se almacenó a -24°C. Los fragmentos de ADN purificados fueron secuenciados por *SeqWright DNA Technology Services* (E.U.A.).

5.4.1.7. Análisis de las secuencias de ADN

La alineación comparativa de las secuencias de las cepas estudiadas se realizó con el programa MEGA4 (E.U.A.) (Tamura *et al.*, 2007), incluyendo información de la base de datos internacional del *European Bioinformatic Institute* (EBI, Cambridge, Inglaterra). Las secuencias se uniformaron, y se analizaron por los métodos de *Neighbor-Joining* y de Máxima Parsimonia. El soporte del agrupamiento filogenético del dendrograma generado fue evaluado por la prueba de *bootstrap*.

5.4.2. Estudio de las cepas de *Trichoderma*

Estas cepas fueron caracterizadas con las mismas técnicas convencionales y moleculares empleadas para el género *Pleurotus*.

5.4.2.1. Procedimiento para la eliminación de bacterias que contaminan las cepas de *Trichoderma*

Algunas de las cepas que se aislaron de plantas productoras de hongos comestibles presentaron persistentemente bacterias contaminantes en el medio de cultivo. En estos casos, se preparó el medio de cultivo PDA con cloranfenicol (0.1 mg/ml). Un pequeño segmento de las hifas de la periferia de las colonias se transfirió a cajas de petri con dicho medio. Posteriormente, las colonias desarrolladas de *Trichoderma* se cultivaron en medio líquido CYM con la misma concentración de cloranfenicol, para concluir el proceso de purificación y eliminación de las bacterias contaminantes. Cuando las bacterias persistieron, se procedió a incrementar la dosis de cloranfenicol a 0.3 mg/ml y 0.5 mg/ml en medio líquido CYM. Después de 48-96 h, se realizó un subcultivo de las cepas a medio líquido CYM sin cloranfenicol para corroborar que el cultivo fuera axénico.

5.4.2.2. Mantenimiento de las cepas de *Trichoderma*

Su mantenimiento en medio sólido tiene desventajas, ya que a temperatura ambiente es necesario resembrar cada dos meses, requiere contar con un área especial de trabajo por la gran cantidad de esporas que se producen. Por tal motivo, las cepas se desarrollaron en medio líquido CYM con y sin cloranfenicol, los cuales se monitorearon por un período de ocho meses, para verificar su viabilidad y la posible presencia de bacterias.

5.5. Confrontación de *Pleurotus* y *Trichoderma*

La respuesta de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* frente al competidor *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* se determinó en medio de cultivo PDA (Bioxon) a un pH control (pH=5.6) y a pH=11 [medio con pH extremo que inhibe el crecimiento de *Trichoderma* (Bonilla, 2006)]. Esto con el objetivo de evaluar la resistencia genética de las cepas de *Pleurotus* aisladas de maguey contra el competidor *Trichoderma*, así como su capacidad para poder desarrollarse sobre un medio selectivo con pH extremo. Asimismo, se evaluó cualitativamente la producción enzimática de lacasas por parte de *Pleurotus* al confrontarse con *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, los cual se consideró como una respuesta de competencia por nutrientes y establecimiento. Para ello se utilizó como sustrato, agregado al medio de cultivo, la sal

diamónica del ácido 2, 2'-azino bis (3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico) [ABTS, CAS 30931-67-0, A1888-5G; Sigma, Canadá; **Tabla 5.16**).

Tabla 5.16. Componentes del medio de agar con dextrosa y papa (PDA) control con la sal diamónica del ácido 2, 2'-azino bis (3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico) [ABTS], y del medio selectivo a pH=11.

Condición	Componente	Concentración en 1000 ml (g)	%
Control (pH=5.6)	PDA	39.0	3.90
	ABTS	0.549	0.055
Tratamiento (pH=11)	PDA	39.0	3.90
	Ca SO ₄	35.2	3.52
	Ca(OH) ₂	8.8	0.88
	ABTS	0.549	0.055

Para la preparación del medio selectivo PDA pH=11, se prepararon y esterilizaron durante 20 min a 15 lb de presión (121°C), todos los componentes por separado. El agar se disolvió en 820 ml, CaSO₄ (J. T. Baker, E.U.A.) en 80 ml, Ca(OH)₂ (J. T. Baker, E.U.A.) en 20 ml, y 60 ml de agua destilada para recuperar remanentes. El ABTS se disolvió en 20 ml de agua destilada estéril y se adicionó al medio estéril junto con todos los demás componentes, filtrándolo con una unidad de filtro de éster celulosa (0.2 µm) de jeringa (DISMIC-25as).

Los parámetros evaluados en esta última etapa fueron los siguientes:

1. Tasa de desarrollo (TD) de todos los cultivos en mm/día.
2. Halo de pigmentación fuerte (HF) y débil (HD) que reveló cualitativamente la producción enzimática de lacasas liberadas al medio por parte de las cepas de *Pleurotus*.
3. Esporulación de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* frente a las cepas de *Pleurotus* en el caso de los co-cultivos y cultivos independientes. La toma de muestra se realizó en tres zonas: la primera en cerca del inóculo de *Trichoderma*, la segunda en la parte media del área de esporulación, y la tercera se realizó en el límite con la cepa estudiada de *Pleurotus* (**Figura. 5.5**). De cada zona se tomaron tres muestras circulares de 5 mm de diámetro para colocarlas en tubos de ensaye con 10 ml de agua destilada estéril y 5 µl de Tween 80 (Sigma Ultra, E.U.A.) como surfactante para reducir la tensión superficial de las esporas de *Trichoderma* y obtener una suspensión homogénea. El conteo de esporas de cada zona se realizó en la cámara de Neubauer (Martínez-Carrera, 1995).

El esquema de trabajo de esta etapa se muestra en la **Figura 5.3**.

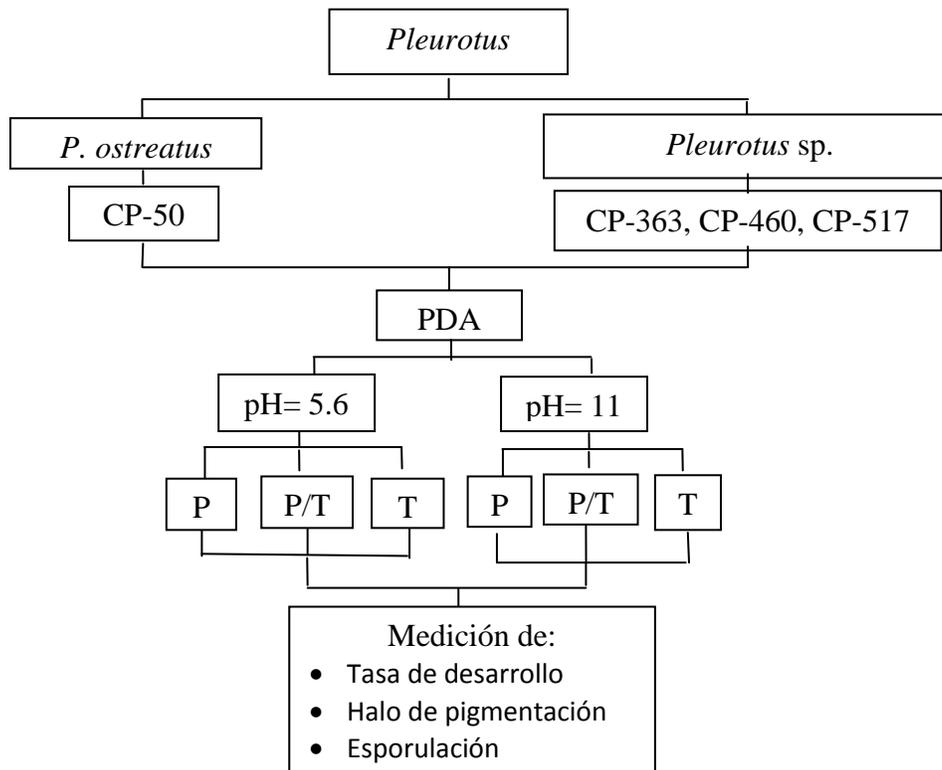


Figura 5.3. Esquema del experimento realizado para confrontar las cepas de *Pleurotus* seleccionadas con *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112). P= *Pleurotus*. P/T= Co-cultivo *Pleurotus-Trichoderma*. T= *Trichoderma*.

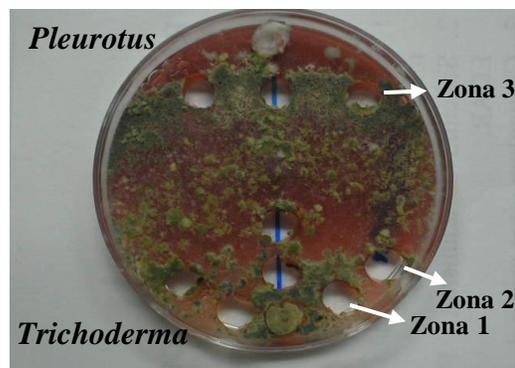


Figura 5.4. Zonas de muestreo para evaluar la esporulación de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112) en confrontación con las cepas seleccionadas de *Pleurotus*.

5.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los estudios experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), conforme a un diseño completamente al azar. Posteriormente, se realizó la comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). En el caso de la evaluación de cepas a nivel módulo experimental, los datos se analizaron con ANOVA, de acuerdo a un diseño de bloques completamente al azar, seguida por una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico STATGRAPHICS Plus para Windows, Versión 4.1 (*Statistical Graphics Corp.*, E.U.A.).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de las cepas de *Pleurotus*

6.1.1. Caracterización microscópica y macroscópica micelial de las cepas estudiadas

De acuerdo con la revisión realizada al microscopio, todas las cepas presentaron fíbulas, donde las dimensiones de la cepa comercial CP-50 fueron pequeñas ($3 \times 3 \mu\text{m}$), en comparación con las cepas CP-425 ($8 \times 5 \mu\text{m}$), CP-364 ($7 \times 6 \mu\text{m}$) y CP-365 ($7 \times 6 \mu\text{m}$). En relación al ancho de las hifas, la cepa que presentó hifas de mayor grosor fue la CP-366 ($2.5 \times 6.5 \mu\text{m}$). La cepa que tuvo muy pocas fíbulas fue la CP-359 (una fíbula por cada tres campos a 100x en el microscopio). Además, en esta misma cepa se encontraron muy pocos septos, mientras que la cepa CP-363 presentó una gran cantidad de fíbulas (61 fíbulas/campo) en una preparación regular y la cepa comercial CP-50 sólo una pequeña proporción de fíbulas. La CP-373 y CP-375 mostraron una fíbula/campo y los septos se localizaron hasta encontrar una fíbula. Otra de las características que se logró registrar de las cepas de *Pleurotus* estudiadas fue la presencia de estructuras en forma de perilla con pedúnculo. (**Figura 6.1**). Esta característica sólo se logró observar en las cepas CP-50, CP-194, CP-358, CP-376 y CP-460 (**Tabla 6.1**). El color del micelio de las diferentes cepas fue blanco, mientras que la densidad fue abundante en los tres medios probados para la cepa CP-50 y CP-424. La textura varió de lanosa, plumosa o algodonosa, siendo la CP-360 la que cubrió los medios probados en el menor tiempo, presentó una textura de lanosa a plumosa de acuerdo al medio (**Tabla 6.4**).

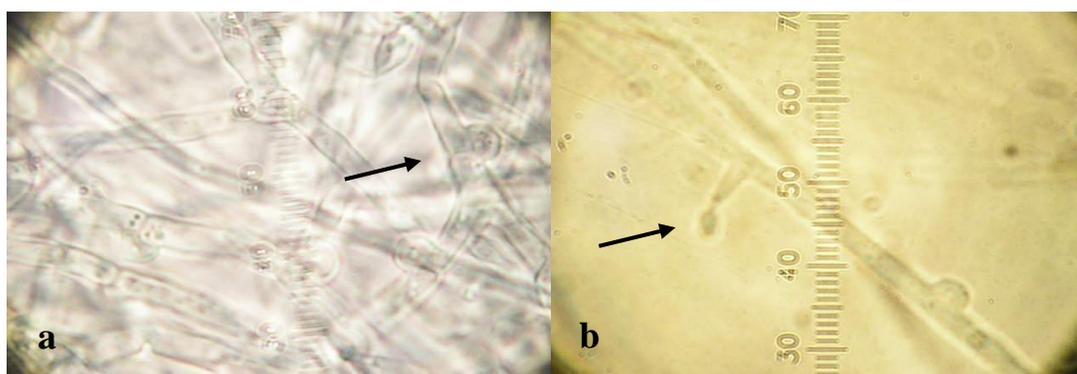


Figura 6.1. Observación microscópica del micelio de las cepas de *Pleurotus* estudiadas: **a:** Fíbulas en una preparación regular, y **b:** Estructuras en forma de perilla con pedúnculo presentes en algunas de las cepas.

Tabla 6.1. Caracterización microscópica de 19 cepas de *Pleurotus sp.* silvestres comparadas con una cepa comercial de referencia (CP-50).

	Cepa	Presencia fíbulas	Fíbulas (μm)	Número de fíbulas	Diámetro hifas (μm)	Observación
1	CP-50	+	3x3	12	1-3	Presencia de perillas con pedúnculo
2	CP-253	+	5x5	6	3-6	-
3	CP-468	+	4x4	25	2-5	-
1	CP-98	+	5x5	9	2-3	
2	CP-194	+	5x5	6	2-4	Presencia de perillas con pedúnculo
3	CP-358	+	5x5	4	3-5	Presencia de perillas con pedúnculo
4	CP-359	+	2x3	<1	3-4	Casi no tiene septos
5	CP-360	+	6x5	11	2-4	-
6	CP-361	+	5x5	24	4-5	-
7	CP-362	+	4x4	9	2-3	-
8	CP-363	+	6x6	61	2-3	-
9	CP-364	+	7x6	22	2-3	-
10	CP-365	+	7x6	13	2-3	-
11	CP-366	+	5x5	14	2.5-6.5	-
12	CP-373	+	6x6	1	1-3	
13	CP-375	+	6x4	1	1-3	
14	CP-376	+	6x5	12	2-3	Presencia de perillas con pedúnculo
15	CP-424	+	5x6	36	2-4	-
16	CP-425	+	8x5	13	1-4	-
17	CP-426	+	6x5	16	1-3	-
18	CP-460	+	5x6	17	2-4	Presencia de perillas con pedúnculo
19	CP-515	+	6x5	9	1-4	-
20	CP-516	+	5x6	15	2-5	-
21	CP-517	+	6x6	22	2-6	Presencia de perillas con pedúnculo
22	CP-518	+	4x5	30	1-4	-
23	CP-524	+	6x6	11	2-5	-
24	CP-525	+	5x5	12	2-6	-

6.1.2. Determinación de la tasa de desarrollo en diferentes medios de cultivo

La mayoría de las cepas se desarrolló mejor en el medio completo con extracto de levadura (CYM) [Figura 6.2.], siendo la cepa CP-360 la que obtuvo la mayor tasa de desarrollo de 8.3 mm/día. En este mismo medio, la CP-375 fue la que obtuvo la menor tasa (0.9 mm/día). El medio PDA fue favorable para las cepas CP-50 (4.0 mm/día), CP-360 (4.6 mm/día), CP-426 (4.4 mm/día) y CP-517 (4.8 mm/día). Para el medio EMA, la cepa que destacó fue la CP-358 (8 mm/día), aunque no se observó una diferencia significativa entre los tres medios que se probaron. La cepa que obtuvo la tasa de desarrollo más baja en el medio EMA fue la CP-516 (Tabla 6.2). En la Tabla 6.3 y 6.4 se muestran las características macroscópicas del micelio de las cepas de referencia y de las cepas estudiadas, en general, en el medio CYM presentaron

mayor densidad y micelio aéreo, las cuales variaron de regular a abundante, y en cuanto a textura predominó plumosa y/o algodonosa.

Tabla 6.2. Caracterización de 27 cepas de *Pleurotus* en 3 medios de cultivo: agar con papa dextrosa (PDA), medio completo con extracto de levadura (CYM) y agar con extracto de malta (EMA)

Cepa	Especie	Tasa de desarrollo (mm/día)					
		Medios de cultivo					
		PDA*		CYM*		EMA*	
CP-50	<i>P. ostreatus</i>	4.0	mnño	6.0	r	4.2	nño
CP-253	<i>P. djamor</i>	1.6	abcdef	3.7	lmnño	3.3	klmn
CP-468	<i>P. sp.</i>	2.1	efghij	3.7	lmnño	3.2	jklmn
CP-98	<i>P. sp.</i>	1.4	abcdef	3.4	lmnño	2.3	efghij
CP-194	<i>P. sp.</i>	1.2	abcdef	2.3	fghijk	2.0	defghi
CP-358	<i>P. sp.</i>	8.1	s	7.5	s	8.0	s
CP-359	<i>P. sp.</i>	3.3	klmnñ	6.3	r	4.8	opq
CP-360	<i>P. sp.</i>	4.6	op	8.3	s	5.7	pqr
CP-361	<i>P. sp.</i>	0.6	ab	1.1	abcde	0.8	ab
CP-362	<i>P. sp.</i>	1.6	abcdefg	6.0	r	3.3	klmn
CP-363	<i>P. sp.</i>	0.6	ab	1.3	abcdef	1.2	abcdef
CP-364	<i>P. sp.</i>	0.8	ab	4.6	op	0.8	ab
CP-365	<i>P. sp.</i>	0.9	abcd	2.0	cdefghi	1.2	abcde
CP-366	<i>P. sp.</i>	1.2	abcdef	4.6	op	3.3	klmn
CP-373	<i>P. sp.</i>	2.8	hijkl	5.7	pqr	2.7	ghijkl
CP-375	<i>P. sp.</i>	0.5	a	0.9	abc	0.7	ab
CP-376	<i>P. sp.</i>	1.1	abcde	1.2	abcde	1.7	bcdefgh
CP-424	<i>P. sp.</i>	1.1	abcde	3.6	lmnño	2.9	ijklm
CP-425	<i>P. sp.</i>	1.6	abcdef	5.8	qr	4.2	nño
CP-426	<i>P. sp.</i>	4.4	ño	7.7	s	4.2	nño
CP-460	<i>P. sp.</i>	0.6	ab	4.5	o	2.1	efghij
CP-515	<i>P. sp.</i>	3.5	klmnñ	5.7	pqr	5.3	pqr
CP-516	<i>P. sp.</i>	0.7	ab	2.3	fghijk	0.3	a
CP-517	<i>P. sp.</i>	4.8	op	5.6	pqr	5.7	pqr
CP-518	<i>P. sp.</i>	0.8	ab	2.5	fghijk	1.6	abcdef
CP-524	<i>P. sp.</i>	3.3	klmnñ	6.2	r	3.9	nño
CP-525	<i>P. sp.</i>	3.1	klmnñ	5.1	op	2.8	ijklm

*= Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las medias, de acuerdo a la Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Tabla 6.3 Caracterización morfológica macroscópica de las cepas de *Pleurotus* de referencia estudiadas, cultivadas en medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA), medio de levadura completo (CYM) y agar con extracto de malta (EMA)(23°C, n=3).

Cepa	Medio de cultivo	Morfológica macroscópica			
		Color	Densidad	Textura	Micelio aéreo
CP-50	PDA	Blanco	Abundante	Algodonosa	Regular
	CYM	Blanco	Abundante	Algodonosa	Abundante
	EMA	Blanco	Abundante	Algodonosa	Regular
CP-253	PDA	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular
	CYM	Blanco	Escaso	Salitrosa	Escaso
	EMA	Blanco	Escaso	Algodonosa	Escaso
CP-468	PDA	Blanco	Abundante	Algodonosa	Abundante
	CYM	Blanco	Regular	Salitroso	Abundante
	EMA	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular

Tabla 6.4 Caracterización morfológica macroscópica de las cepas de *Pleurotus* aisladas de maguey estudiadas, cultivadas en medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA), medio de levadura completo (CYM) y agar con extracto de malta (EMA)(23°C, n=3).

Cepa	Medio de cultivo	Morfológica macroscópica			
		Color	Densidad	Textura	Micelio aéreo
CP-98	PDA	Blanco	Abundante	Plumosa	Regular
	CYM	Blanco	Abundante	Aterciopelada	Regular
	EMA	Blanco	Regular	Algodonosa	Abundante
CP-194	PDA	Blanco	Abundante	Algodonosa	Regular
	CYM	Blanco	Regular	Aterciopelada	Muy escaso
	EMA	Blanco	Regular	Algodonosa	Escaso
CP-358	PDA	Blanco	Regular	Plumosa	Abundante
	CYM	Blanco	Abundante	Algodonosa	Regular
	EMA	Blanco	Escaso	Plumosa	Escaso
CP-359	PDA	Blanco	Abundante	Plumosa	Abundante
	CYM	Blanco	Abundante	Plumosa	Abundante
	EMA	Blanco	Regular	Plumosa	Regular
CP-360	PDA	Blanco	Abundante	Plumosa	Abundante
	CYM	Blanco	Escaso	Lanosa	Escaso
	EMA	Blanco	Regular	Plumosa	Regular
CP-361	PDA	Blanco	Escaso	Aterciopelado	Escaso
	CYM	Blanco	Abundante	Lanosa	Regular
	EMA	Blanco	Regular	Aterciopelado	Escaso
CP-362	PDA	Blanco	Regular	Plumosa	Regular
	CYM	Blanco	Regular	Plumosa	Regular
	EMA	Blanco	Escaso	Lanosa	Escaso
CP-363	PDA	Blanco	Escaso	Plumosa	Escaso
	CYM	Blanco	Regular	Plumosa	Regular
	EMA	Blanco	Escaso	Plumosa	Regular
CP-364	PDA	Blanco	Abundante	Lanosa	Regular
	CYM	Blanco	Abundante	Plumosa	Abundante
	EMA	Blanco	Regular	Lanosa	Escaso
CP-365	PDA	Blanco	Escaso	Lanosa	Escaso

	CYM	Blanco	Regular	Lanosa	Regular
	EMA	Blanco	Escaso	Lanosa	Escaso
CP-366	PDA	Blanco	Abundante	Plumosa	Regular
	CYM	Blanco	Abundante	Plumosa	Abundante
	EMA	Blanco	Regular	Plumosa	Abundante
CP-373	PDA	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular
	CYM	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular
	EMA	Blanco	Abundante	Algodonosa	Regular
CP-375	PDA	Blanco	Regular	Lanosa	Escaso
	CYM	Blanco	Regular	Lanosa	Escaso
	EMA	Blanco	Escaso	Lanosa	Muy escaso
CP-376	PDA	Blanco	Abundante	Plumosa	Abundante
	CYM	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular
	EMA	Blanco	Escaso	Algodonosa	Escaso
CP-424	PDA	Blanco	Abundante	Algodonosa	Regular
	CYM	Blanco	Abundante	Plumosa	Regular
	EMA	Blanco	Abundante	Plumosa	Abundante
CP-425	PDA	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular
	CYM	Blanco	Regular	Espuma seca	Abundante
	EMA	Blanco	Regular	Plumosa	Regular
CP-426	PDA	Blanco	Escaso	Algodonosa	Regular
	CYM	Blanco	Regular	Espuma seca	Regular
	EMA	Blanco	Escaso	Plumosa	Regular
CP-460	PDA	Blanco	Regular	Algodonosa	Escaso
	CYM	Blanco	Escaso	Plumosa	Regular
	EMA	Blanco	Escaso	Algodonosa	Escaso
CP-515	PDA	Blanco	Regular	Plumosa	Abundante
	CYM	Blanco	Regular	Plumosa	Abundante
	EMA	Blanco	Regular	Plumosa	Abundante
CP-516	PDA	Blanco	Regular	Lanosa	Regular
	CYM	Blanco	Regular	Lanosa	Regular
	EMA	Blanco	Regular	Plumosa	Regular
CP-517	PDA	Blanco	Regular	Plumosa	Muy abundante
	CYM	Blanco	Abundante	Plumosa	Muy abundante
	EMA	Blanco	Regular	Plumosa	Muy abundante
CP-518	PDA	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular
	CYM	Blanco	Abundante	Algodonosa	Abundante
	EMA	Blanco	Regular	Plumosa	Regular
CP-524	PDA	Blanco	Regular	Plumosa	Regular
	CYM	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular
	EMA	Blanco	Regular	Plumosa	Abundante
CP-525	PDA	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular
	CYM	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular
	EMA	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular

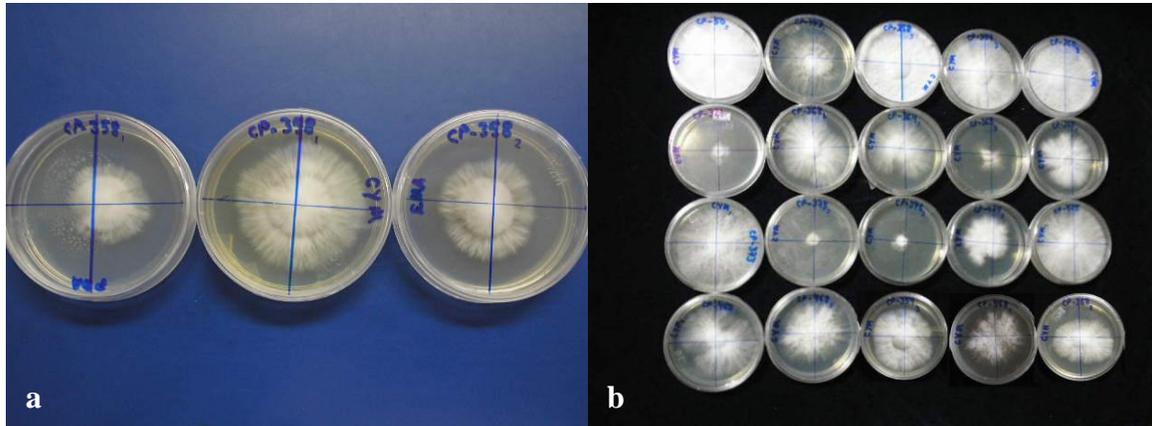


Figura 6.2. Crecimiento característico de las cepas de *Pleurotus* estudiadas. **a:** La cepa CP-358 desarrollándose sobre agar con papa dextrosa (PDA), medio completo con extracto de levadura (CYM) y agar con extracto de malta (EMA); y **b:** Morfología macroscópica de diferentes cepas estudiadas (CYM).

6.1.3. Evaluación de la competitividad comercial a nivel módulo experimental

Debe señalarse que los resultados de esta etapa de la investigación fueron afectados por la huelga laboral que afectó al Colegio de Postgraduados, a principios de 2010, razón por la cual se presentan a continuación los datos más relevantes.

6.1.3.1. Primera fructificación

De las cepas estudiadas, las más prometedoras resultaron ser la CP-362 y la CP-460, las cuales mostraron excelentes tiempos en la fase de producción, y obtuvieron las eficiencias biológicas más altas superando a la cepa comercial, presentando un color llamativo, forma y sabor diferentea (**Figura 6.3**). Sin embargo, dichas cepas no tuvieron los mejores resultados en la caracterización morfológica macroscópica, ni las mejores tasas de desarrollo en los 3 medios probados. En relación a la colonización del substrato, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las cepas CP-50, CP-253, CP-361, CP-460 y CP-468, cuya colonización se presentó entre 13 a 17 días. Para la aparición de los primordios, la cepa comercial los desarrolló a los 25.5 días, mientras que la cepa CP-460 requirió un tiempo mayor de 41 días a partir de la inoculación. Un dato interesante al realizar este estudio fue analizar la eficiencia biológica en relación al tiempo que requirió para obtener la segunda cosecha (momento en que se realizó el corte para la evaluación). La CP-50 obtuvo una EB de 32.92% en un tiempo de 72 días, en 2

cosechas (TP = 0.4572), mientras que la CP-460 logró una EB de 58.04% en una cosecha, en un periodo de 54 días (1.0748) [Tabla 6.5.]. Las condiciones del módulo de fructificación fueron temperaturas máximas de 15-27°C y mínimas de 11-15 ° C, con una humedad relativa de 32-89% (Figura 6.4).

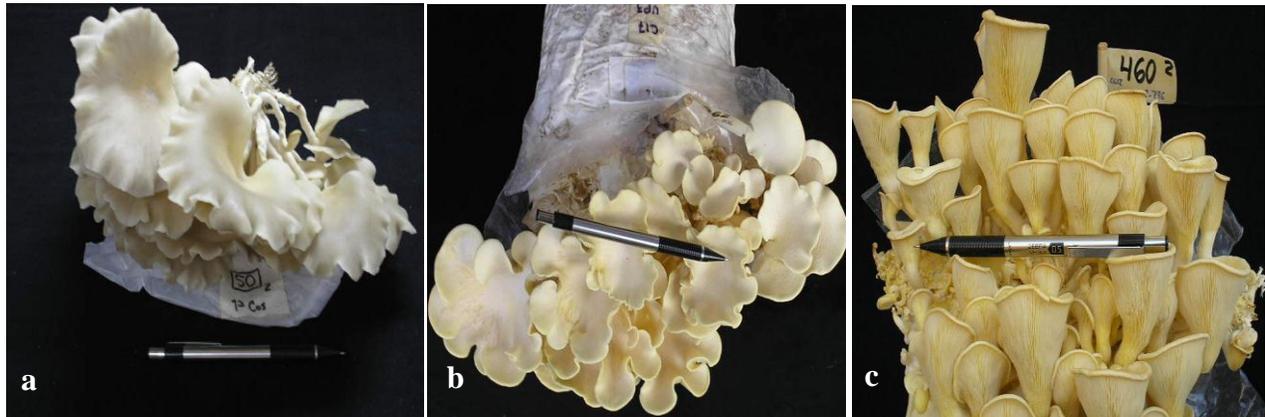


Figura 6.3. Fructificaciones de las cepas de *Pleurotus* que obtuvieron los mejores resultados en comparación con la cepa comercial: **a:** CP-50 (cepa de referencia), **b:** CP-362 con fructificaciones color crema, y **c:** CP-460 con fructificaciones de color amarillento.

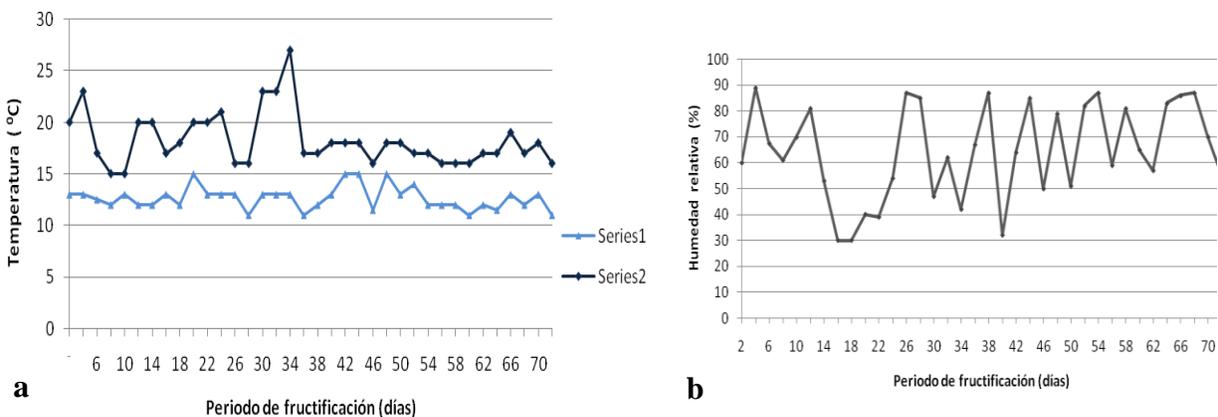


Figura 6.4. Principales condiciones ambientales registradas durante la primera fructificación de las cepas de *Pleurotus*. **a:** Temperaturas máximas (15-27°C) y mínimas (11-15°C). **b:** Humedad relativa (32-89%).

Tabla 6.5. Períodos de tiempo registrados en la fase de producción (1ª. Fructificación), número de cosechas y eficiencia biológica de 20 cepas de *Pleurotus*.

Cepa	FASE DE PRODUCCIÓN										
	Tiempo (días)						Cosechas*	EB* (%)	TP		
	CS*	APP*	TUC*								
CP-50	15.0	abc	25.5	b	72	d	2	d	32.92	c	0.4572
CP-253	17.3	abcd	24.5	b	70	d	2	d	17.59	b	0.2512
CP-468	13.0	a	24.8	b	55	bc	1	b	12.21	b	0.2220
CP-194	33.3	j	-	a	-	a	-	a	-	a	-
CP-358	26.5	hi	72	f	-	a	-	a	-	a	-
CP-359	19.4	cde	-	a	-	a	-	a	-	a	-
CP-360	25.3	ghi	-	a	-	a	-	a	-	a	-
CP-361	17.0	abcd	-	a	-	a	-	a	-	a	-
CP-362	19.0	bcde	26.8	bc	58	c	1	b	35.70	c	0.6155
CP-363	28.0	ij	-	a	-	a	-	a	-	a	-
CP-364	19.5	bcdef	-	a	-	a	-	a	-	a	-
CP-365	21.5	defgh	-	a	-	a	-	a	-	a	-
CP-366	19.8	cdefg	33.8	d	56	c	1.3	bc	20.17	b	0.3601
CP-373	24.8	fghi	72	f	-	a	-	a	-	a	-
CP-375	23.2	efghi	-	a	-	a	-	a	-	a	-
CP-376	22.0	defgh	70	f	-	a	-	a	-	a	-
CP-424	22.0	defgh	29.8	c	51	b	1.5	c	21.52	b	0.4219
CP-425	25.8	hi	-	a	-	a	-	a	-	a	-
CP-426	25.8	hi	72	f	-	a	-	a	-	a	-
CP-460	14.2	ab	41	e	54	bc	1	b	58.04	d	1.0748

*= Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las medias, de acuerdo a la Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).
 CS= Colonización del sustrato (período desde la inoculación). APP= Aparición de primordios de fructificación (período desde la inoculación).
 TUC= período para la última cosecha al momento de la evaluación, desde la inoculación. EB= Eficiencia biológica (%). TP= Tasa de producción.

También se realizó una evaluación en cuanto a plagas y enfermedades durante la fase de producción de la primera fructificación de las cepas de *Pleurotus* (Tabla 6.6), incluyendo diversas especies de mohos e insectos en diferentes estadios, principalmente del género *Lycoriella*.

En la evaluación se determinó como porcentaje la presencia de bacterias y mohos en la superficie del sustrato, e insectos en sustrato y fructificaciones. De las 11 cepas que estaban fructificando al momento de la evaluación, nueve de ellas presentaron bacterias en el micelio de la superficie del sustrato, manifestándose como manchas cafés, en donde ya no se volvían a formar primordios. Así, las cepas que presentaron un mayor porcentaje de bacterias fueron la CP-366 (40%), CP-361 (37.5%) y CP-362 (35%). De estas cepas, las dos últimas presentaron un

sistema de defensa muy débil, ya que se encontraban en la primera cosecha. Diferente es el caso de la CP-366 que se encontraba entre la tercera y cuarta cosecha, por lo que su sistema de defensa se encontraba en una etapa decreciente. Es importante destacar los valores encontrados en la cepa de referencia CP-50 (15%), la cual a pesar de estar en el mismo número de cosechas, el porcentaje bacteriano fue reducido. De igual forma, las cepas que tuvieron un bajo porcentaje de bacterias entre la tercera y cuarta cosecha fueron las cepas CP-253 (13.5%), CP-424 (16.3%) y CP-468 (3.7%). Las cepas que estaban fructificando y que no presentaron bacterias fueron la CP-460 en la cosecha 3-4, y la cepa CP-359 en la primera cosecha.

Tabla 6.6. Estimación de la proporción de bacterias, mohos competidores e insectos en las unidades de producción de las cepas de *Pleurotus* estudiadas.

Cepa	Cosechas	Bacterias (%)	Mohos (%)	Insectos (%)
CP-50	3.5	15.0	-	7.5
CP-253	4	13.5	7.5	6.0
CP-468	3.7	17.5	20	11
CP-194	0	-	-	-
CP-358	0	-	-	-
CP-359	1	-	5.0	5
CP-360	0	-	-	-
CP-361	1	37.5	5	-
CP-362	1	35.0	15	3.7
CP-363	0	-	-	-
CP-364	0	-	-	-
CP-365	0	-	-	-
CP-366	3.5	40.0	-	20
CP-373	0	-	-	-
CP-375	1	18.8	13.8	20
CP-376	1	11.8	1	1.2
CP-424	3.5	16.3	5	13.8
CP-425	0	-	-	-
CP-426	0	-	-	-
CP-460	3.5	-	1	4

En relación a la presencia de mohos en la superficie del substrato, nueve cepas presentaron mohos, la cepa CP-468 (20%) tuvo el mayor porcentaje, con tres tipos de mohos

caracterizados únicamente por su coloración verde, blanca o naranja. El más bajo porcentaje lo presentaron las cepas CP-460 (1%, moho naranja) y la CP-376 (1%, moho verde).

Al evaluar la presencia de insectos, se encontró que la cepa CP-460 estuvo gravemente afectada, hasta en un 40%, por insectos (Lepidópteros), particularmente una especie de polilla de la que se encontraron huevos, larvas y pupas. El daño principalmente fue causado por las larvas que hicieron túneles en el interior de los cuerpos fructíferos. Las larvas fueron blanquecinas con manchas cafés y la cabeza también café, con una longitud de aproximadamente 5-7 mm (**Figuras 6.5 y 6.6**). Las demás cepas no fueron afectadas por este insecto, aunque estuvieran fructificando. Otro insecto encontrado fue la mosquita *Lycoriella*, pero sin causar serios daños, ya que normalmente consumen el micelio de la superficie de la unidad de producción. Su mayor porcentaje se registró en la cepa CP-375 (20%), desde la primera cosecha, y en la CP-366 (20%). La presencia de *Lycoriella* en la cepa CP-460 fue del 4%. Así, puede decirse que las cepas más susceptibles a plagas y enfermedades (en un módulo con hongos desarrollándose en las últimas cosechas) son la CP-361, CP-362, CP-366, CP-375 y CP-460. En este caso, se recomendaría a los productores la importancia del saneamiento del área de producción, y sincronizar las unidades de producción hasta la segunda o máximo tercera cosecha de hongos, para evitar problemas de plagas y enfermedades.



Figura 6.5. Características de la etapa larval vista al microscopio estereoscópico del insecto lepidóptero que afecto las fructificaciones de las cepas estudiadas de *Pleurotus*. Las larvas midieron aproximadamente 10-12 mm de largo.

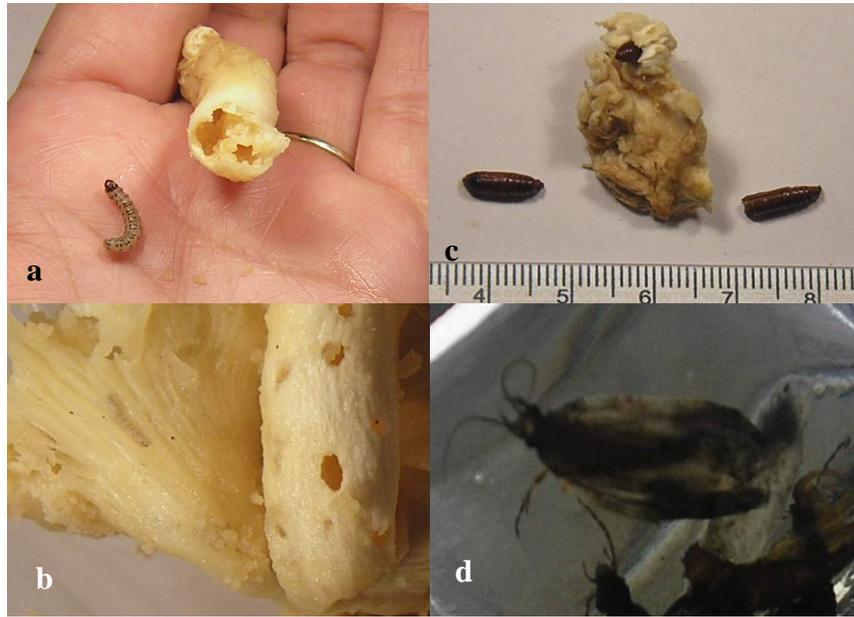


Figura 6.6. Diferentes etapas de los insectos (Orden: Lepidoptera, Género: *Plodia* sp.) que causaron serios daños a la cepa CP-460 de *Pleurotus* sp. durante la primera fructificación. **a:** Larva que generó túneles en el interior del estípite. **b:** Daño causado por larvas en todo el cuerpo fructífero. **c:** Pupa enterrada en el cuerpo fructífero y pupas completas a los lados. **d:** Imago.

6.1.3.2. Segunda fructificación

Debido a que la mayoría de las cepas no fructificaron, y por las condiciones que propiciaron la presencia de plagas y enfermedades, se decidió realizar una segunda evaluación de la etapa de producción por un periodo mayor de tiempo (tanto incubación, como fructificación) y se registraron las condiciones ambientales en el módulo experimental (**Figura 6.7**). Se obtuvieron los períodos de colonización del substrato, aparición de primeros primordios de fructificación, última cosecha, número de cosechas, eficiencia biológica y tasa de producción (**Tabla 6.7**; **Figura 6.8**).

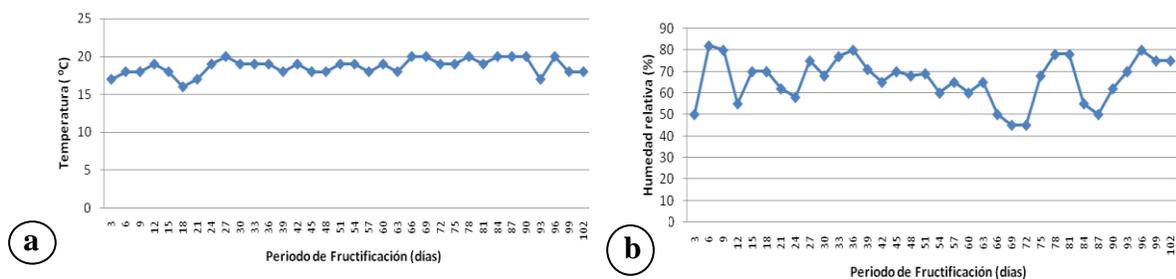


Figura 6.7. Condiciones ambientales registradas en el módulo experimental durante la segunda fructificación de las cepas estudiadas de *Pleurotus*. **a:** Temperaturas (16-20°C). **b:** Humedad relativa (45-80%).

Tabla 6.7. Períodos en la fase de producción, a partir de la inoculación, correspondientes al número de cosechas, eficiencia biológica (EB), y tasa de producción (TP) de la **segunda fructificación** de las cepas estudiadas de *Pleurotus*.

Cepa	FASE DE PRODUCCIÓN							
	Período (días)			No Cos	EB (%)		TP	
	CS	APP	TUC					
CP-50	14.0	27.8	66.5	2.0	56.43 ± 2.88	g	0.7102 ± 0.18	d
CP-253	13.8	15.5	52.5	2.0	47.90 ± 1.18	efg	0.8796 ± 0.03	d
CP-468	15.3	18.0	35.8	2.0	24.90 ± 2.10	abcdefg	0.6665 ± 0.06	cd
CP-194	58.5	0.0	0.0	0.0	0.00 ± 0.00	abcdefg	0.0000 ± 0.00	a
CP-358	20.0	67.0	115.0	1.0	5.43 ± 2.64	abcdefg	0.0355 ± 0.02	ab
CP-359	26.6	79.3	101.3	1.5	22.33 ± 1.85	abcdefg	0.1652 ± 0.01	ab
CP-360	25.0	135.0	0.0	0.0	0.00 ± 0.00	abcdefg	0.0000 ± 0.00	a
CP-361	26.0	103.3	113.0	1.0	2.63 ± 1.83	abcdefg	0.0173 ± 0.01	ab
CP-362	21.0	50.0	79.8	1.3	26.77 ± 10.99	abcdefg	0.2736 ± 0.07	ab
CP-363	21.0	91.5	112.5	1.5	51.43 ± 15.89	fg	0.3796 ± 0.12	bcd
CP-364	22.0	99.0	119.3	1.0	3.50 ± 0.85	abcdefg	0.0220 ± 0.00	ab
CP-365	20.0	94.0	118.0	1.0	10.40 ± 10.40	abcdefg	0.0662 ± 0.00	abc
CP-366	10.0	11.0	34.0	2.0	32.17 ± 2.21	abcdefg	0.8906 ± 0.07	d
CP-373	24.5	71.5	114.5	1.5	32.90 ± 7.88	bcdefg	0.2440 ± 0.05	ab
CP-375	18.8	27.3	91.0	2.0	14.17 ± 7.25	abcdefg	0.1166 ± 0.02	ab
CP-376	19.0	94.8	108.8	1.0	1.07 ± 0.29	abcdefg	0.0081 ± 0.00	a
CP-424	10.0	20.5	45.3	2.0	31.97 ± 0.69	abcdefg	0.6583 ± 0.06	cd
CP-425	19.5	90.5	133.0	1.3	33.00 ± 2.54	bcdefg	0.2223 ± 0.02	ab
CP-426	24.0	41.6	106.3	1.5	34.07 ± 9.11	cdefg	0.2404 ± 0.05	abc
CP-460	14.3	33.3	65.5	2.0	47.37 ± 2.83	efg	0.6817 ± 0.05	cd
CP-515	17.0	143.5	166.0	1.5	10.87 ± 4.42	abcdefg	0.0651 ± 0.02	ab
CP-516	19.0	163.8	168.0	1.0	2.30 ± 0.00	abcdefg	0.0134 ± 0.00	ab
CP-517	13.0	62.0	154.0	2.0	44.86 ± 5.84	defg	0.2560 ± 0.05	ab
CP-518	25.3	110.0	162.7	1.3	14.67 ± 7.97	abcdefg	0.0896 ± 0.04	ab
CP-524	30.5	96.0	160.3	1.5	16.20 ± 7.62	abcdefg	0.0969 ± 0.04	ab
CP-525	32.0	143.0	172.5	1.5	22.37 ± 2.63	abcdefg	0.1288 ± 0.00	ab

*= Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las medias, de acuerdo a la Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).
 CS= Colonización del sustrato (período desde la inoculación). APP= Aparición de primordios de fructificación (período desde la inoculación).
 TUC= período para la última cosecha al momento de la evaluación, desde la inoculación. EB= Eficiencia biológica (%). TP= Tasa de producción.

La colonización del sustrato (CS) más rápida se presentó en las cepas CP-424 (10 días), CP-366 (10 días), CP-517 (13 días), CP-253 (13.8 días), CP-50 (14 días) y CP-460 (14.3 días), entre las cuales no se encontró diferencia significativa, mientras que las cepas que requirieron mayor tiempo para colonizar el sustrato fueron la CP-524 (30.5 días) y CP-525 (32.0 días).

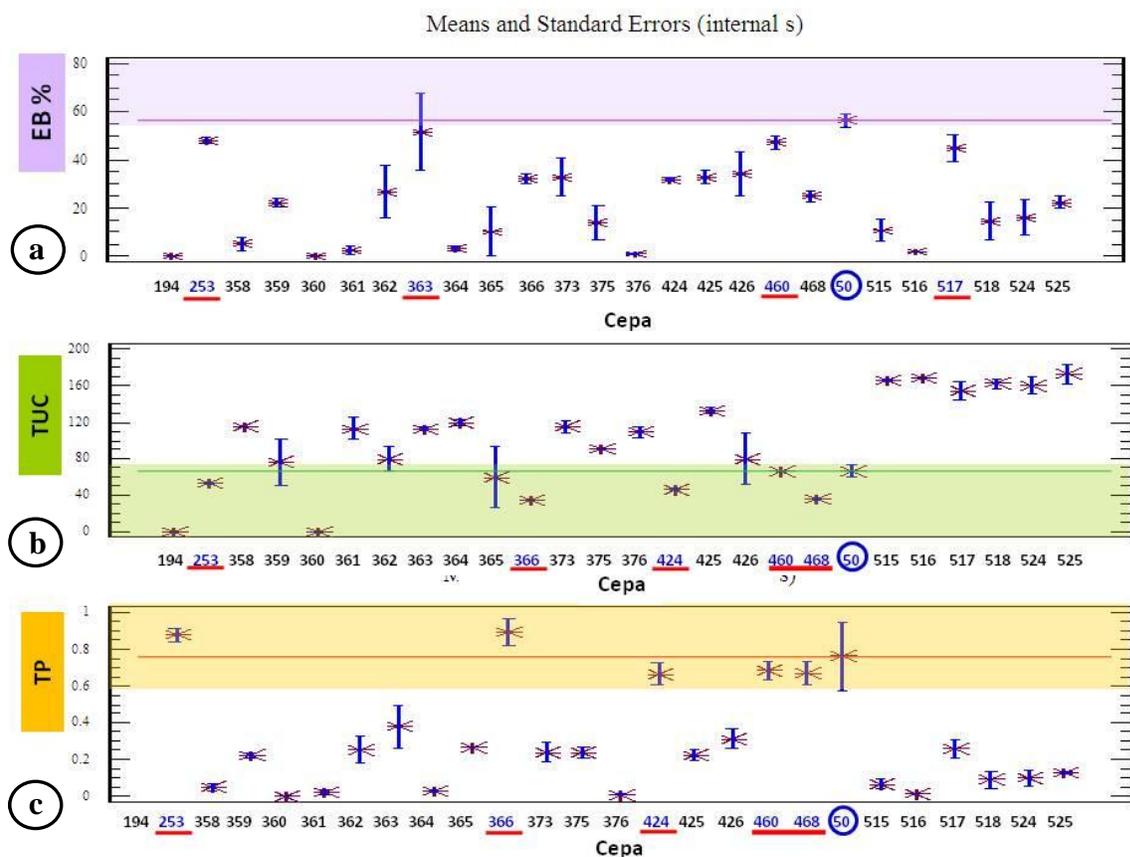


Figura 6.8. Media y error estándar de los parámetros evaluados sobre la competitividad comercial de la segunda fructificación de las cepas estudiadas de *Pleurotus*. **a:** Eficiencia biológica (EB, %). **b:** Tiempo para obtener la última cosecha (TUC). **c:** Tasa de producción (TP).

La aparición de los primeros primordios de fructificación (APP) fue temprana, y equiparable con la cepa comercial CP-50 (27.8 días), en las cepas CP-366 (11 días), CP-253 (15.5 días), CP-468 (18 días), CP-424 (20.5 días), CP-375 (27.3 días). Las que aparecieron en seguida fueron la CP-460 (33.3 días), CP-426 (41.6 días), y CP-362 (50 días). En el resto de las cepas se prolongó más, siendo las últimas cepas en fructificar la CP-525 (143 días), CP-515 (143.5 días), y CP-516 (168 días). El número de cosechas que se obtuvo varió de 1 a 2 cosechas.

El menor período requerido para obtener la última cosecha (TUC) fue registrado en las cepas CP-366 (34 días), CP-468 (35.8 días), CP-424 (45.3 días), CP-253 (52.5 días), CP-460

(65.5 días), CP-50 (66.5 días), CP-362 (79.8 días), CP-375 (91 días), CP-359 (101.3 días), CP-426 (106.3 días) y CP-365 (118 días). Por el contrario, las cepas que presentaron el período más prolongado para fructificar, fueron las cepas CP-517 (154 días), CP-524 (160.3 días), CP-518 (162.7 días), CP-515 (166 días), CP-516 (168 días) y CP-525 (172.5 días).

Las cepas que destacaron en promedio por eficiencia biológica (EB, %) fueron la CP-50 (56.4%), CP-253 (47.90%), CP-363 (51.43%), CP-460 (47.37%) y CP-517 (44.86), entre las que no hubo diferencia estadística. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa de la cepa comercial con respecto a otras cepas que presentaron una mayor variabilidad: CP-362, CP-366, CP-373, CP-424, CP-425, CP-426, y CP-468.

Considerando la eficiencia biológica y el tiempo para obtener la última cosecha se obtuvo la tasa de producción (TP), donde los valores más altos fueron alcanzados por la cepa CP-366 (0.8906), CP-253 (0.8796), CP-50 (0.7102), CP-460 (0.6817), CP-468 (0.6665), CP-424 (0.6583) y CP-363 (0.3796), entre las que no hubo diferencia significativa.

En la **Figura 6.9** se aprecia gráficamente el comportamiento de las cepas evaluadas en relación a los parámetros de eficiencia biológica, tiempo para obtener la última cosecha y la tasa de producción; en donde el área con color representó la zona de valores óptimos. Así puede observarse que las cepas estudiadas compiten con la cepa de referencia CP-50, ya sea porque se encuentren incluidas en la zona de valores óptimos, o bien se aproximen a ella. Las cepas que destacaron en los tres parámetros alternativos junto con la CP-50, fueron la CP-253 y CP-460. Aquellas que presentaron TUC y TP competitivos solamente fueron la CP-366, CP-424 y CP-468.

Por otra parte, las condiciones ambientales registradas durante la segunda fructificación de las cepas estudiadas de *Pleurotus* resultaron más estables (temperatura: 16-20°C; humedad relativa: 45-80%), con respecto a aquellas de la primera fructificación (temperatura: 15-27°C; humedad relativa: 32-89%).

De acuerdo con los valores óptimos alcanzados durante la etapa de producción por las cepas estudiadas en relación con la cepa comercial (**Tabla 6.8**) se consideró como cepas relevantes: CP-50, CP-253, CP-366, CP-424, CP-460 y CP-468. Algunas de estas cepas se incluyeron en la etapa final de esta investigación, que correspondió a la determinación de la resistencia natural contra *Trichoderma aggressivum*, así como a la determinación de su cinética de producción de lacasas. La caracterización de las fructificaciones se encuentra en el ANEXO B.

Tabla 6.8. Comparación de las cepas estudiadas de *Pleurotus* consideradas competitivas con aquellas de referencia, en relación a los parámetros evaluados. Los datos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

	Cepa	CS	APP	TUC	EB	TP
		(días)	(días)	(días)	(%)	
1	CP-50	14.0	27.8	66.5	56.43	0.7102
2	CP-253	13.8	15.5	52.5	47.90	0.8796
3	CP-468		18.0	35.8		0.6665
4	CP-362		50.0	79.9		
5	CP-363				51.43	0.3796
6	CP-366	10.0	11.0	34.0		0.8906
7	CP-375		27.3	91.0		
8	CP-424	10.0	20.5	45.3		0.6583
9	CP-426		41.6			
10	CP-460	14.3	33.3	65.5	47.37	0.6817
11	CP-517	13.0			44.86	

6.1.4. Caracterización organoléptica

6.1.4.1. Prueba preliminar de las características organolépticas

Un aspecto importante para introducir nuevas cepas de hongos comestibles al mercado son las características organolépticas, tales como sabor y consistencia. Para ello, los cuerpos fructíferos de las cepas seleccionadas, se cocinaron y evaluaron.

Al momento de ser cocinados los “Hongos del Maguey”, en general, se pudo percibir un aroma agradable de mayor intensidad en comparación con la cepa comercial CP-50. Los hongos se frieron (ca. 15 min) completamente por ser fibrosos, lo cual mejoró su consistencia. Durante

la degustación de cada una de las cepas de *Pleurotus*, se logró percibir un mejor sabor en relación con la cepa de referencia.

De acuerdo con los resultados de la caracterización organoléptica preliminar (**Tabla 6.9.**), en cuanto a sabor, todas las cepas de “Hongos del Maguey” superaron a la cepa comercial de referencia CP-50. Las cepas con sabor muy intenso fueron la CP-358, CP-363, CP-366, CP-373 y CP-525, mientras que las cepas con sabor suave fueron la CP-361, CP-364, CP-375, CP-315 y CP-524.

La CP-50 se consideró con sabor poco intenso y de consistencia suave, mientras que las cepas estudiadas de “Hongos del Maguey” fueron de sabor agradable intenso o moderado.

Por otra parte, en cuanto al resultado obtenido al evaluar la consistencia, siete cepas presentaron una consistencia equivalente a la cepa comercial (CP-361, CP-364, CP-375, CP-376, CP-426, CP-468, CP-525). Las cepas catalogadas como firmes suaves fueron la CP-359, CP-362, CP-365, CP-366, CP-515). Las cepas que presentaron una consistencia firme similar a la “carne” fueron la CP-194, CP-358, CP-363, CP-424 y CP-517, las cuales son competitivas en términos de sus propiedades organolépticas (sabor, consistencia). En la **Tabla 6.10** se especifican aquellas cepas recomendables principalmente por el criterio de consistencia, ya que algunas cepas pueden ser muy agradables en sabor, pero su consistencia no es aceptable (coriácea). En general, todo el material estudiado es valioso, ya que algunas cepas presentaron características favorables, aunque pueden carecer de otras que podrían mejorarse por mejoramiento genético. Las cepas de *Pleurotus* que se consideraron recomendables para la producción comercial fueron la CP-50, CP-253, CP-366, CP-424, CP-460 y CP-468. En este aspecto es importante considerar las demandas del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles en México. Una observación experimental importante fue el hecho de que los “Hongos del Maguey” tuvieron una mayor viabilidad postcosecha que las cepas de referencia.

Tabla 6.9 Características organolépticas de las cepas de *Pleurotus* estudiadas en prueba preliminar.

Cepa	Sabor	Consistencia	Recomendable	Cepa	Sabor	Consistencia	Recomendable
CP-50	1	1	Si	CP-373	4	6	-
CP-253	2	4	-	CP-375	3	1	Si
CP-468	2	1	Si	CP-376	2	1	Si
CP-194	2	3	Si	CP-424	2	3	Si
CP-358	4	3	Si	CP-425	2	0	Si
CP-359	3	2	Si	CP-426	2	1	Si
CP-360	-	-	-	CP-460	2	5	-
CP-361	3	1	Si	CP-515	3	2	Si
CP-362	2	2	Si	CP-516	2	6	-
CP-363	4	3	Si	CP-517	2	3	Si
CP-364	3	1.	Si	CP-518	2	5	-
CP-365	2	2.	Si	CP-524	3	4	-
CP-366	4	2	Si	CP-525	4	1	Si

Al reunir los valores óptimos obtenidos en la evaluación de la competitividad por producción (sin diferencia significativa), y los valores registrados en la evaluación de la competitividad por propiedades organolépticas (**Tabla 6.10.**), fue posible tener mayor certeza de cuáles son las cepas prometedoras a corto plazo. Es decir, aquellas cepas con posibilidades de insertarse al mercado, o bien, incluirlas de manera inmediata en las investigaciones presentes, como recursos genéticos viables y de gran valor. En este caso, se recomendaron 11 cepas para la última etapa de este trabajo de investigación, correspondiente a la caracterización enzimática. Los resultados demostraron que, de las siete variables analizadas, las cepas con mayor potencial fueron la CP-253, CP-366, CP-424, y CP-460. De estas, la primera y la última presentaron son recursos con buenas características. Por otra parte, en la **Tabla 6.10** también se muestran aquellas cepas poco competitivas contra la cepa comercial, aunque tuvieron buen sabor y consistencia.

Tabla 6.10. Comparación de las cepas estudiadas de *Pleurotus* con aquellas de referencia, en lo que respecta a los parámetros evaluados de producción y propiedades.

		Competitividad						Propiedades organolépticas			Criterios cubiertos
		Producción					CC/P	S	C	C/PO	
Cepa		CS (días)	APP (días)	TUC (días)	EB (%)	TP					
1	CP-50	14.0	27.8	66.5	56.43	0.7102	Si	1	1	Si	7
2	CP-253	13.8	15.5	52.5	47.90	0.8796	Si	2	4	No	6
3	CP-468		18.0	35.8		0.6665	Si	2	1	Si	5
4	CP-362		50.0	79.9			No	2	2	Si	4
5	CP-363				51.43	0.3796	No	4	3	Si	4
6	CP-366	10.0	11.0	34.0		0.8906	Si	4	2	Si	6
7	CP-375		27.3	91.0			No	3	1	Si	4
8	CP-424	10.0	20.5	45.3		0.6583	Si	2	3	Si	6
9	CP-426		41.6				No	2	1	Si	3
10	CP-460	14.3	33.3	65.5	47.37	0.6817	Si	2	5	No	6
11	CP-517	13.0			44.86		No	2	3	Si	4

CS= Colonización del sustrato. APP= Aparición de primeros primordios. TUC= Período para la última cosecha. EB= Eficiencia biológica. TP= Tasa de producción. CC/P= Cepa competitiva por producción. S= Sabor (escala: 0= Insípido, 1= Poco intenso, 2= Agradable, 3= Sabroso, 4= Delicioso). C= Consistencia (escala: 0= Muy suave, 1= Suave, 2= Firme suave, 3= Similar a “carne”, 4= Ligeramente coriácea, 5= Coriácea, 6= Muy coriácea). C/PO= Competitiva por propiedades organolépticas.

6.1.4.2. Evaluación exploratoria de aceptación por consumidores

Los resultados de las dos evaluaciones dieron a conocer una aproximación del impacto que pudieran tener en el mercado las cepas de *Pleurotus* aisladas de maguey, y fueron los siguientes:

6.1.4.2.1. Preferencia de compra

Los encuestados registraron el orden de preferencia de compra por aspecto (de mayor a menor grado) de hongos frescos representativos de cada cepa. De acuerdo con los resultados mostrados en la **Tabla 6.11**, en la categoría de los hongos que se comprarían primero se registró la cepa CP-363 (62.5%), seguida por la CP-50 (50%) en segundo término, la CP-460 (40%) en tercer término, la CP-426 (30.8%) en cuarto término, la CP-425 (30.8%) en quinto término, y la comercial Monte Rey (27.3%) en sexto término. Así se puede observar que varias cepas de “Hongos del Maguey” compiten con las cepas comerciales. En resumen, el estudio exploratorio

indicó que la cepa que un consumidor elegiría en primer lugar sería la CP-363, en segundo lugar la CP-50, y en tercer lugar la CP-460.

Tabla 6.11. Preferencia de compra (%) por apariencia de las fructificaciones (*Pleurotus*) por parte de consumidores no expertos, tomando como referencia dos cepas comerciales.

Categoría	Cepa	Proporción (%)
1°	CP-363	62.5
2°	CP-50	50.0
3°	CP-460	40.0
4°	CP-426	30.8
5°	CP-425	30.8
6°	Monte Rey	27.3

6.1.4.2.2. Evaluación exploratoria de las propiedades organolépticas de las cepas de *Pleurotus* por consumidores no expertos

Para la evaluación exploratoria de las características de olor, sabor y consistencia con consumidores no expertos, se consideró una escala de nueve categorías (Anzaldúa, 2005).

1) *Olor*. Los hongos que fueron catalogados con mayor porcentaje como que “les gustaba muchísimo” (primera categoría) por su olor según la opinión de los jueces consumidores: Monte Rey (30.8%). En la segunda categoría por olor, expresada como que “les gustaba mucho” con un mayor porcentaje mencionaron a las cepas: CP426 (33.3%) y CP460 (33.3%). Se observa una gran tendencia de las cepas de *Pleurotus* de maguey a agradar por su olor y principalmente las cepas CP425, CP426 y CP460 (**Tabla 6.12**).

Tabla 6.12. Evaluación del olor por parte del consumidor final, de cuatro cepas de *Pleurotus* de maguey y una cepa comercial, considerando una escala de nueve categorías, según Anzaldúa (2005).

Categoría	Cepa	Proporción (%)
1°	Monte Rey	30.8
2°	CP-426, CP-460	33.3
3°	CP-363	50.0
4°	CP-425	14.3

2) *Sabor*. De las cepas evaluadas por los jueces consumidores en cuanto a sabor, las cepas de *Pleurotus* de maguey sobresalieron en relación con la cepa comercial (Monte Rey) destacando en la categoría 1, correspondiente a “me gusta muchísimo” la cepa CP363 (35.7%); y la cepa CP425 (30%) fue equiparable con la Monte Rey (30%). En la segunda categoría (“Me gusta mucho”) destacaron las cepas CP426 (60%), CP425 (50%) y CP460 (50%). También en este parámetro, en la categoría 8 (“Me disgusta mucho”) sólo se presentó la cepa CP426 (**Tabla 6.13**).

Tabla 6.13. Evaluación del sabor por parte del consumidor final, de cuatro cepas de *Pleurotus* de maguey y una cepa comercial, considerando una escala de nueve categorías, según Anzaldúa (2005).

Categoría	Cepa	Proporción (%)
1°	CP-363	35.7
2°	CP-426	27.3
3°	CP-460, Monte Rey	50.0
4°	CP-425	16.7

3) *Consistencia*. En este parámetro, los encuestados eligieron en primer término a la cepa comercial Monte Rey (71.4%), en segundo lugar a las cepas que les gustó muchísimo en cuanto a consistencia fueron la CP-425 y la CP-426 (20.0%); y en tercer lugar a las cepas CP-363 y CP-460 (33.3%) (**Tabla 6.14**). Es importante mencionar que la cepa que se mencionó

también como que les gustó muchísimo fue la CP425 (28.6%) junto con la comercial Monte Rey (71.4%). Y la cepa que desagradó muchísimo en relación a la consistencia fue la CP426.

Tabla 6.14 Evaluación de la consistencia por parte del consumidor final, de cuatro cepas de *Pleurotus* de maguey y una cepa comercial, considerando una escala de nueve categorías, según Anzaldua (2005).

Categoría	Cepa	Proporción (%)
1°	Monte Rey	71.4
2°	CP-425, CP-426	20.0
3°	CP-363, CP-460	33.3

6.1.5. Aspectos relevantes de la caracterización de *Pleurotus*

De acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización microscópica, macroscópica y de la evaluación de la competitividad comercial durante la primera y segunda fructificación, se consideró que ni la presencia de una gran cantidad de fíbulas en el micelio, ni elevada tasa de desarrollo en medio de cultivo, son parámetros que indiquen buena competitividad comercial de una cepa.

Por otra parte, se confirmó que la presencia de estructuras en forma de perilla con pedúnculo en el micelio están asociadas al género *Pleurotus*, aunque no en todas las cepas estudiadas (27). Sólo se observaron en las cepas CP-50, CP-194, CP-358, CP-376, CP-460 y CP-517. Según Thorn & Tsuneda (1993) y Hibbett (1994), dichas estructuras están relacionadas con atrapar nemátodos, y han sido reportadas en *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland, *P. cystidiosus* O.K. Miller, *P. levis* (Berk. & Curt.) Sing., *P. ostreatus* (Uacq. : Fr.) Kummer, *P. populinus* Hilber & Vilgalys, y *P. pulmonarius* (Fr. : Fr.) Quéll..De acuerdo con Barron & Thorn (1987), la función de estas estructuras es secretar una toxina (ácido trans-2-decanóico), la cual paraliza a los nemátodos, que posteriormente son invadidos por las hifas del hongo.

En relación a los parámetros evaluados en la competitividad comercial durante la primera fructificación, se puede decir que las cepas de *Pleurotus* prometedoras a nivel comercial fueron:

CP-460 y CP-362. Estas cepas presentaron una eficiencia biológica y tasa de producción mayor a aquellas de la cepa comercial CP-50. Cabe destacar que entre las plagas y enfermedades registradas en el cultivo de las cepas estudiadas de *Pleurotus* no se han reportado en la bibliografía los lepidópteros como un problema grave. Sin embargo, si se tienen registros de esciáridos (*Lycoriella*) [Hussey & Gurney, 1968; Snetsinger, 1972; Fletcher *et al.*, 1997], los fóricos (*Megaselia*) [Johal & Disney, 1994; Krishnamoorthy *et al.* 1991; Mohan *et al.*, 1995, Wetzal *et al.*, 1982], los cecidómidos (*Heteropeza*, *Mycophila*) [Ferri, 1985; Vedio, 1993, Wetzal *et al.*, 1982], los colémbolos (*Hypogastrura*, *Lepidocyrtus*, *Seira*) [Ferri, 1985; Sandhu & Arora, 1994], y los pigmefóricos (*Bakerdania*) [De Lillo, 1997]. Por otra parte, en la segunda fructificación, se demostró que con una limpieza rigurosa es posible mantener sana la producción de hongos comestibles, sin problemas serios de plagas y/o enfermedades.

Los resultados que se obtuvieron de la segunda fructificación de la producción, más la evaluación exploratoria de la preferencia de compra y percepción organoléptica se presentan en la **Tabla 6.15**.

Tabla 6.15. Cepas que destacaron en los siete criterios de producción, y análisis exploratorio de las propiedades organolépticas y preferencia de consumidores no expertos.

Criterios	Cepa
7	CP-50
6	CP-253, CP3-66, CP-424, CP-460
5	CP-468
4	CP-362, CP-363, CP-375, CP517
3	CP-426
Compra	CP-363, CP-50, CP-460, CP-426, CP-425, Monte Rey
Olor	Monte Rey, CP-363, CP-426, CP-460, CP-425
Sabor	CP-363, CP-425, Monte Rey, CP-426, CP-425, CP-460
Consistencia	Monte Rey, CP-425, CP-363, CP-460

Los resultados de algunas de las cepas de “Hongos del Maguey” (*Pleurotus*) son prometedores, con la ventaja de que algunas de sus características comerciales pueden mejorar mediante un programa adecuado de mejoramiento genético. Aunque existen cepas de *P.*

pulmonarius que han sido estudiadas con este fin comercial (Vogel & Salmenes, 2000), el germoplasma utilizado fue extranjero. En cambio, Por otra parte, las cepas de los “Hongos del Maguey” son abundantes, presentan diversidad genética, tienen sabor muy agradable e intenso por lo que podrían comercializarse como un *gourmet*.

6.1.6. Caracterización enzimática de las cepas de *Pleurotus*

6.1.6.1. Determinación de la cinética de lacasas de las cepas seleccionadas

La actividad enzimática se evaluó con 4 substratos: DMP (2, 6-dimetoxifenol), Siringaldazina (SYR, Sigma, E.U.A.), ABTS [2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] (Sigma, E.U.A.) y Guaiacol (GY, Sigma, E.U.A.). Con ellos se pudo observar la afinidad de las lacasas de *Pleurotus* por determinado substrato, de la misma manera que en el corrimiento enzimático en los geles de poliacrilamida (PAGE).

De los cuatro substratos que se utilizaron para evaluar la actividad enzimática, la mayor respuesta se presentó con DMP en las **tres** cepas que se estudiaron, sin embargo, la producción de las enzimas es muy diferente entre las tres especies. Esto fue similar a las observaciones realizadas por Cho *et al.* (2002), quienes determinaron las actividades de lacasas y peroxidases durante las etapas de desarrollo de primordio y fructificación de *P. ostreatus* y *P. sajor-caju*. En el caso de *P. ostreatus*, el nivel de la peroxidasa dependiente de Mn se encontró baja en la etapa de primordio y gradualmente se incrementó con el desarrollo del cuerpo fructífero, mientras que en *P. sajor-caju*, no se detectó actividad en ninguna de las etapas. Así, en el presente trabajo se demostraron diferencias significativas en la producción de lacasa a nivel micelial en *P. ostreatus* (CP-50), *P. djamor* (CP-253), y *P. sp.* (“Hongos del Maguey”). En el substrato DMP, la cepa CP-50 presentó su mayor actividad a las 48 h con un valor de 292.55 U/ml, mientras que la cepa CP-253 obtuvo un valor máximo de 39.96 U/ml a las 120 h, y la cepa CP-460 presentó su actividad máxima a las 96 h, con una actividad de 142.86 U/ml (**Tabla 6.16**).

Tabla 6.16. Actividad volumétrica (AV) de lacasas de las cepas de referencia de *Pleurotus ostreatus* (CP-50) y *P. djamor* (CP-253), en comparación con una cepa seleccionada de los “Hongos del Maguey” (*Pleurotus* sp.; CP-460).

Tiempo (h)	Actividad volumétrica (U/ml)		
	CP-50	CP-253	CP-460
0	3.49	0.00	7.66
24	24.95	1.04	2.99
44	268.16	10.62	20.78
48	292.54	11.6	15.32
72	243.82	25.46	49.35
96	119.46	36.96	142.86
120	64.94	39.96	115.06
144	39.50	10.22	92.04

Por otra parte, al realizar el corrimiento electroforético, en el caso de la cepa CP-50, en el carril que corresponde a las 72 h se comenzaron a observar dos bandas, lo cual indicó que se están produciendo dos isoenzimas. La primera y más definida se ubicó en la parte baja del gel y fue de bajo peso molecular. En cambio, la CP-253 mostró sólo una banda difusa en la parte superior del gel, la cual fue de alto peso molecular y gradualmente se definió entre las 72 y 120 h (**Figura 6.9**).

Al evaluar la producción enzimática con SYR, la CP-50 obtuvo su máximo a las 48 h, con un valor de 78.74 U/ml, mientras que la CP-253 logró su valor máximo a las 120 h con 18.29 U/ml (**Figura 6.10**). Estos resultados se vieron reflejados en el gel de poliacrilamida, donde se apreciaron bandas más tenues que las observadas con DMP. Es decir, las enzimas producidas no presentaron gran afinidad por la SYR, en comparación con el DMP.

En cuanto al comportamiento de la cinética que presentan las enzimas producidas, se observó en todos los casos un pico de producción, el cual decreció posteriormente. Esto puede deberse a que los nutrientes se agotaron, o bien, a que la concentración de metabolitos producidos por el micelio inhibieron la producción enzimática. En cuanto a la variación

interespecífica en los niveles enzimáticos, es claro que la cepa CP-253 mostró niveles inferiores de lacasas, probablemente porque se trata de una cepa silvestre, sin mejoramiento genético, y por ser una característica de la especie.

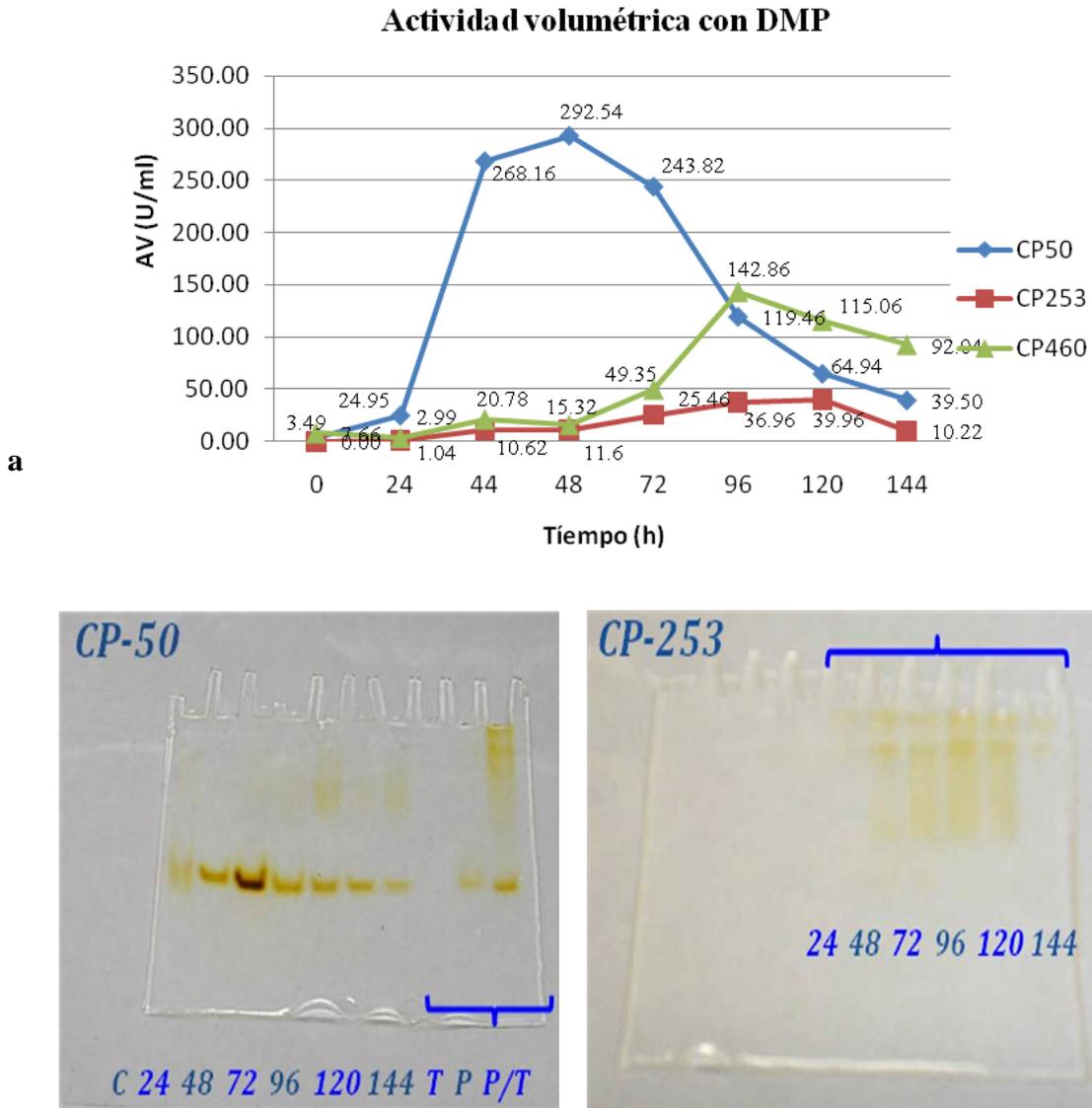


Figura 6.9. Evaluación de la actividad volumétrica (AV) de lacasas utilizando DMP: **a:** Cinética de las cepas CP-50, CP-253 y CP-460 de *Pleurotus*. **b:** Corrimiento electroforético (PAGE).

Actividad volumétrica con SYR

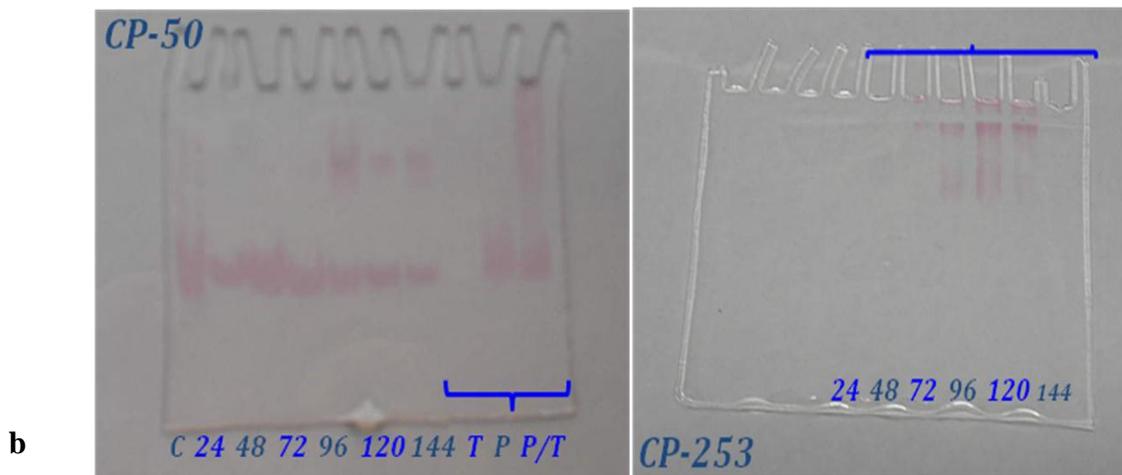
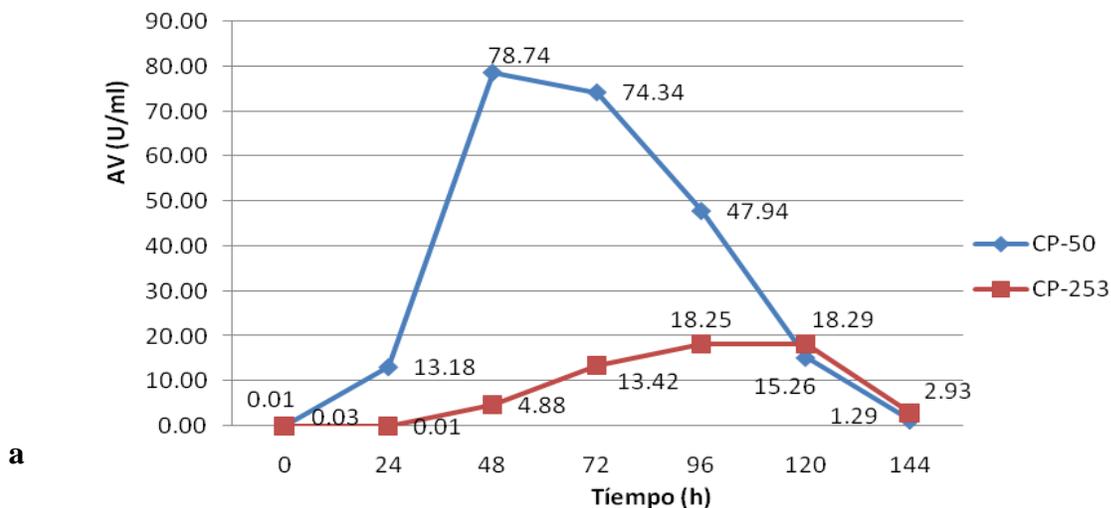


Figura 6.10. Evaluación de la actividad volumétrica de lacasas utilizando Siringaldazina (SYR). **a:** Cinética de las cepas CP-50 y CP-253 de *Pleurotus*. **b:** Corrimiento electroforético (PAGE).

La actividad enzimática de las lacasas con el substrato ABTS fue más baja en comparación con DMP y SYR, donde la producción máxima de enzima para la CP-50 se presentó a las 48 h y 72 h, con una actividad enzimática sobre el substrato ABTS de 43.67 y 44.66 U/ml, respectivamente. En la CP-253, el valor máximo se determinó a las 120 h, con 21.66 U/ml. En el

gel, se observó una doble banda a las 48 h en el caso de la cepa CP-50, esto representó la presencia de dos isoenzimas. Conforme transcurre el tiempo, la isoenzima de menor peso molecular disminuyó, en tanto que la isoenzima de mayor peso molecular se definió mejor conforme transcurrió el tiempo (**Figura 6.11**).

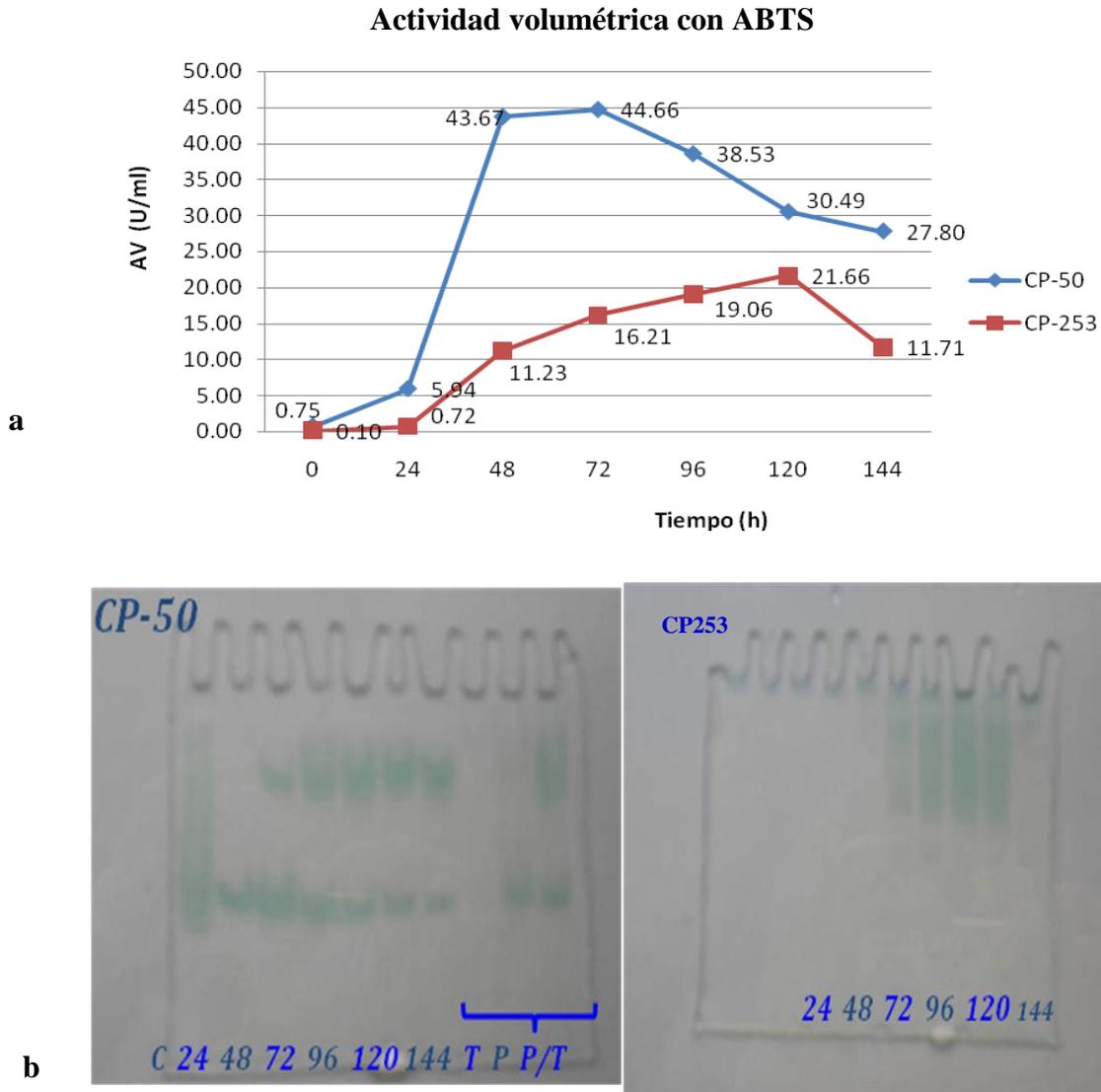


Figura 6.11. Evaluación de la actividad volumétrica de lacasas utilizando ABTS. **a:** Cinética de las cepas CP-50 y CP-253 de *Pleurotus*. **b:** Corrimiento electroforético (PAGE).

Finalmente, al evaluar con el substrato de GY, la afinidad enzimática por este substrato resultó ser muy baja para la cepa CP-50, con un máximo a las 48 h de 38.79 U/ml. Esto

correspondió en el corrimiento electroforético a una banda un poco más marcada que el resto y, es importante hacer notar, que en este caso, sólo se pudo observar una sola banda producida. En las determinaciones con los otros sustratos, se presentaron dos bandas, correspondientes a dos isoenzimas con diferente afinidad al sustrato. Sin embargo, en la cepa CP-253, cuyos valores enzimáticos fueron muy bajos y que alcanzó un pico a las 120 h, con una actividad enzimática de 5.61 U/ml, no fue posible revelarla en el gel de poliacrilamida (**Figura 6.12**). A futuro, valdría la pena repetir el experimento incrementando las concentraciones enzimáticas.

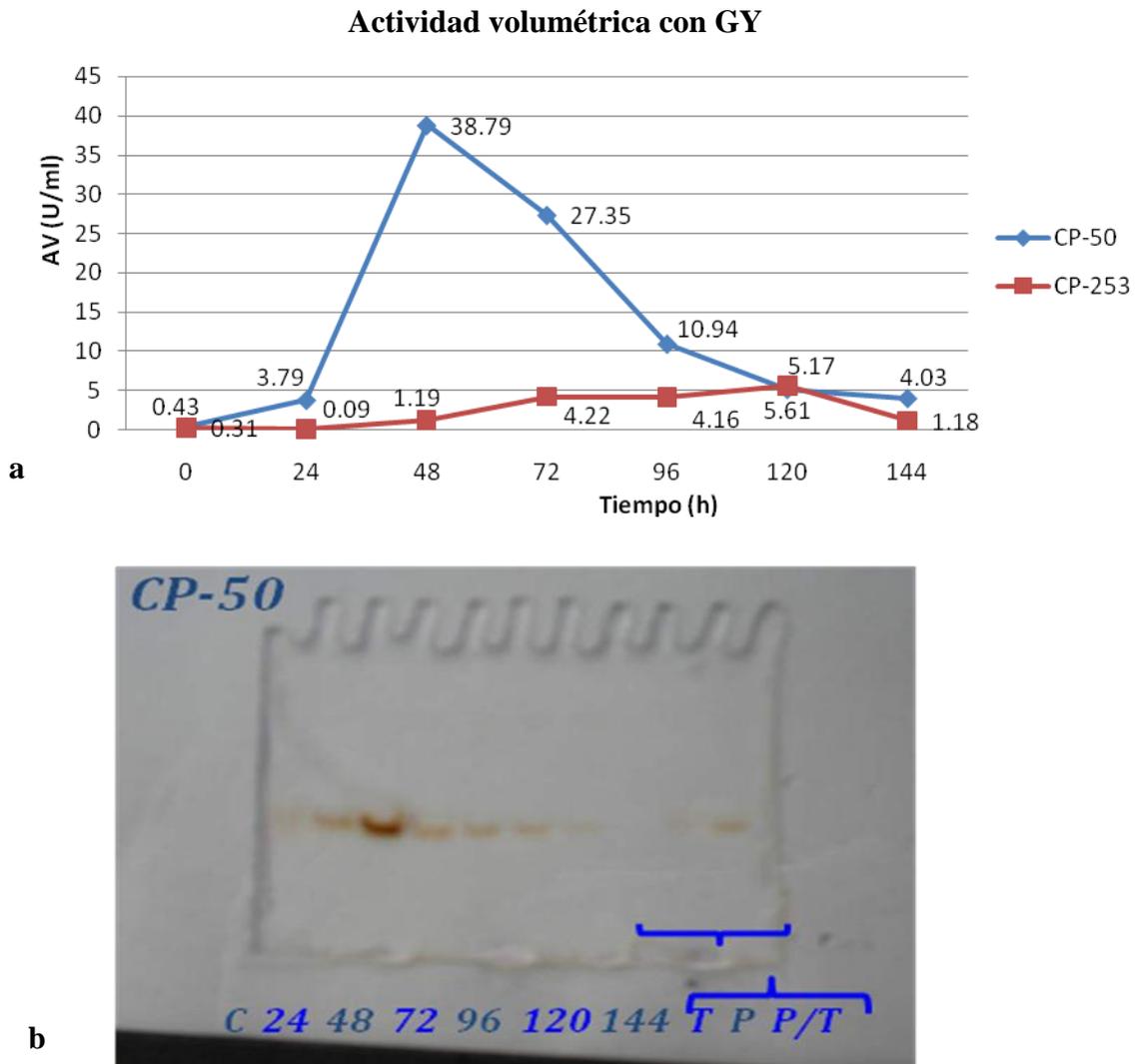


Figura 6.12. Evaluación de la actividad volumétrica de lacasas utilizando guaiacol: **a:** Cinética de las cepas CP-50 y CP-253 de *Pleurotus*; **b:** Corrimiento electroforético (PAGE).

6.1.6.2. Determinación de biomasa de las cepas seleccionadas de *Pleurotus*

Al analizar los resultados obtenidos en la producción de biomasa de la cepa CP-50 y la CP-253, se demostró que la cepa CP-253 produjo una mayor cantidad con un máximo de producción de biomasa de 3.6381 g/L a las 144 h, aunque sus *pellets* fueron más pequeños que aquellos de la CP-50, aproximadamente un 50%. Por su parte, la CP-50 presentó la mayor producción de biomasa a las 144 h, con un valor de 2.2545 g/L (Figura 6.13).

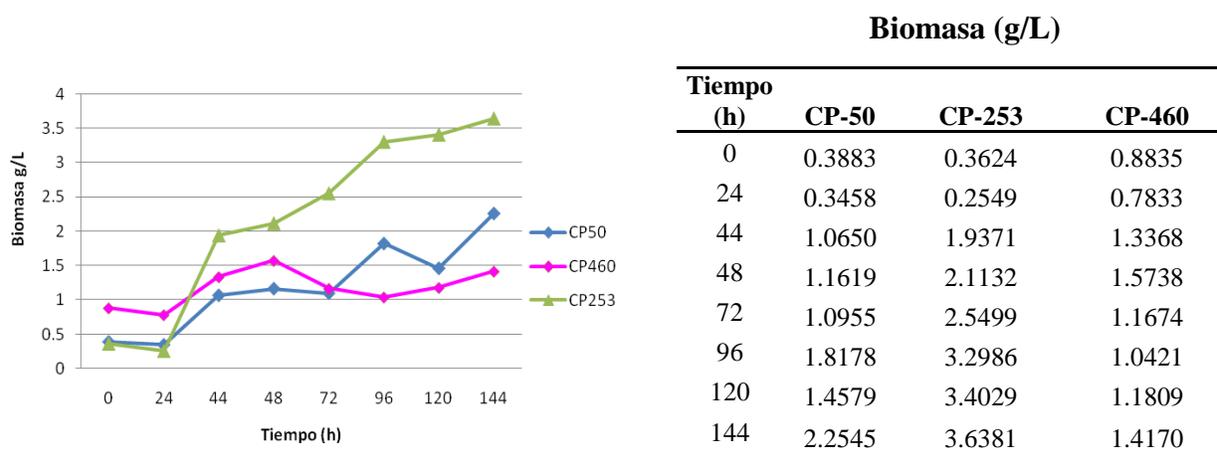


Figura 6.13. Biomasa producida por las cepas CP-50 de *Pleurotus ostreatus* y CP-253 de *P. djamor* en extracto de malta líquido (EML). **a:** Perfil de la producción de biomasa. **b:** Datos cuantitativos (experimentos independientes).

6.1.6.3. Producción de proteínas en medio líquido de las cepas seleccionadas de *Pleurotus*

La producción de proteína en EML fue en general mayor en la cepa CP-50, en comparación con la cepa CP-253 de *P. djamor*. La CP-50 obtuvo un valor pico a las 48 h (35.7105 µg/ml), posteriormente decreció bruscamente a las 72 h (25.2632 µg/ml), manteniéndose de esa forma en valores muy cercanos hasta llegar a las 144 h del fin del experimento. Este decremento posiblemente se puede explicar por una paulatina inactivación de las enzimas presentes en función del tiempo. Por su parte, la cepa CP-253 mostró un comportamiento realmente confuso, ya que, al parecer, consume las proteínas del medio, pero esto no se refleja en la producción enzimática a las 96 y 144 horas. Se recomienda estudiar a mayor profundidad el comportamiento de las proteínas en ambas especies (Figura 6.14).

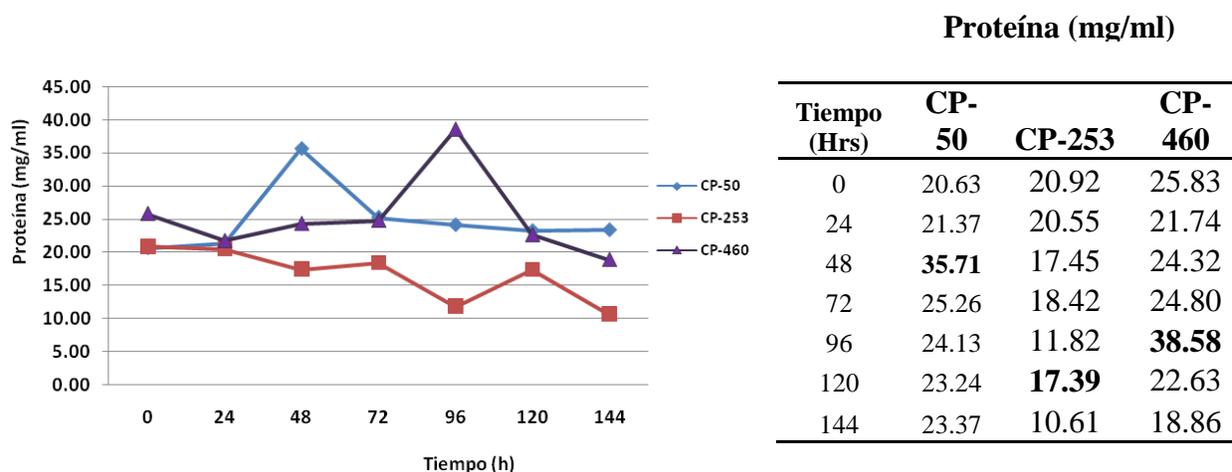


Figura 6.14. Producción de proteína de las cepas CP-50 (*Pleurotus ostreatus*), CP-253 (*P. djamor*) y CP-460 (*P. sp.*) en extracto de malta líquido (EML). **a:** Perfil de la producción de proteína. **b:** Datos cuantitativos.

6.1.6.4. Determinación de la actividad enzimática de lacasas en medio de agar de *Pleurotus ostreatus* (CP-50) y de *Trichoderma aggressivum* (CPM-64)

Los resultados mostraron una mayor afinidad enzimática por el substrato DMP, por parte de la cepa CP-50 (DMP, 15.96 U/ml; SYR, 5.84 U/ml; ABTS, 5.86 U/ml). En el caso del co-cultivo CP-50 vs. CPM-64 (*Pleurotus* vs. *Trichoderma*) en medio EMA, la actividad enzimática se incrementa notablemente 3.8 veces más que el control CP-50 de *Pleurotus* (15.96 U/ml), dando un valor de 61.76 U/ml. Esto coincidió con las bandas que aparecen en el gel de poliacrilamida. Este resultado confirmó lo establecido por Baldrian (2004, 2006), cuando discutió el aumento en la degradación de xenobióticos que se presenta cuando se co-cultivan los hongos de la pudrición blanca y microorganismos indígenas del suelo. Para la CPM-64 de *Trichoderma*, la cantidad encontrada fue insignificante, por lo que no hubo ninguna reacción positiva que se pudiera detectar en el gel con los diferentes substratos (**Tabla 6.17; Figura 6.15**).

Tabla 6.17. Actividad volumétrica (AV) de lacasas (U/ml) en medio de agar con extracto de malta de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* y CPM-64 de *Trichoderma aggressivum*.

Cepa	AV (U/ml)		
	DMP	SYR	ABTS
CP-50	15.96	5.84	5.86
CP-50 vs. CPM-64	61.76	10.16	11.48
CPM-64	0.88	0.12	0.08

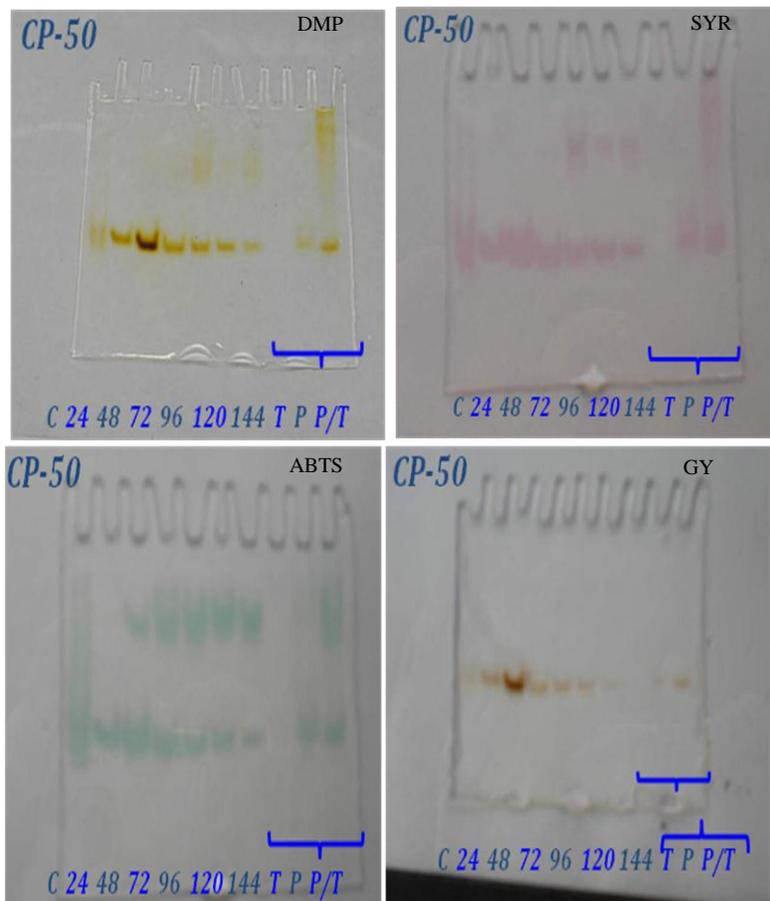


Figura 6.15. Corrimiento electroforético de las proteínas de sobrenadante del co-cultivo de la cepa CP-50 vs. CPM-64, y las cepas control [carriles de la derecha: *Trichoderma* (T), *Pleurotus* (P), *Pleurotus* vs. *Trichoderma* (P/T)], revelando las bandas con los substratos DMP, SYR, ABTS y GY.

6.1.7. Análisis a nivel molecular de las cepas de *Pleurotus*

En la **Figura 6.16** se muestra un ejemplo de los geles utilizados para confirmar la cantidad y calidad de la extracción del ADN de las cepas de *Pleurotus* estudiadas. Por su parte, en la **Figura 6.17** se presenta el ejemplo de los productos amplificados por PCR de la región ITS del ADNr.

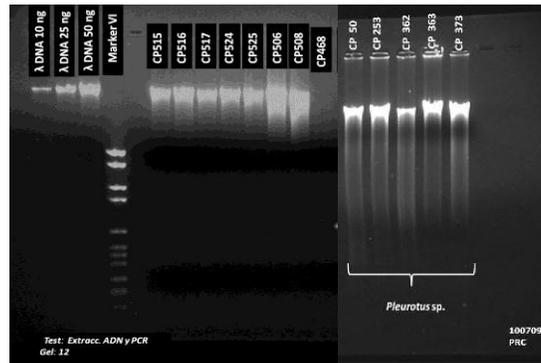


Figura 6.16. Evaluación de la cantidad y calidad del ADN extraído del micelio de algunas cepas estudiadas de *Pleurotus*.

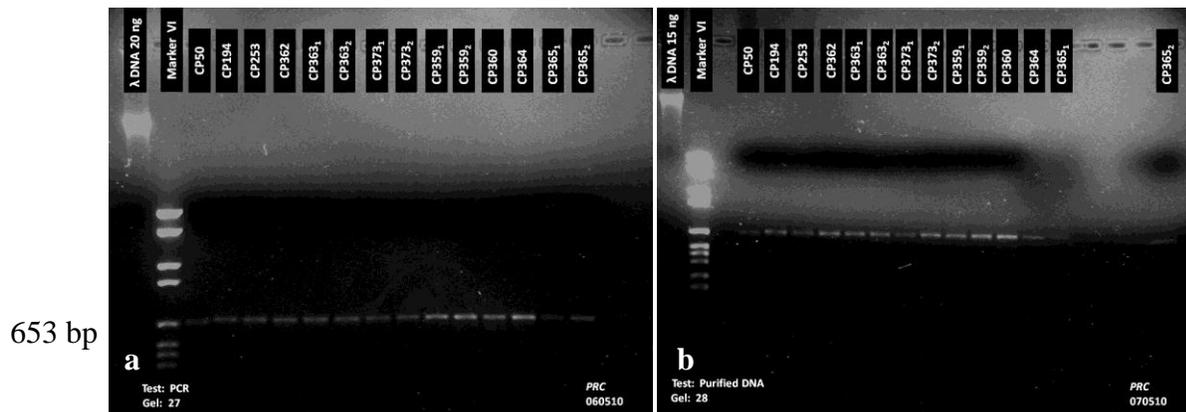


Figura 6.17. Evaluación de la cantidad y calidad del producto de PCR de la región ITS del ADNr, tanto amplificado (a) como purificado (b).

Las secuencias en estudio tuvieron alrededor de 640-730 pares de bases, de las cuales se usaron 639 bp para realizar el análisis de reconstrucción de la filogenia de las cepas estudiadas por el método de máxima parsimonia y por el método de *Neighbor-Joining*. En un primer análisis, las secuencias se alinearon y se ajustaron sus extremos, eliminando los segmentos no identificados y obteniendo un árbol filogenético por el método de *Neighbor-Joining*, con una prueba de *Bootstrap* de 1000 réplicas, empleando una secuencia de *Hohenbuehelia* como grupo externo (**Figura 6.18**). Su matriz de distancia genética se muestra en la **Figura 6.19**. La mayor

parte de las secuencias de “Hongos del Maguey” se agruparon en un linaje monofilético que incluyó cepas de los Estados de Puebla y Morelos, con amplia distancia genética entre ellas. Un sublinaje incluyó dos cepas de referencia de *P. djamor* (CP-253, CP-468), y dos cepas cercanas genéticamente de “Hongos del Maguey” (CP-366, CP-424). La cepa CP-98 de “Hongos del Maguey” se agrupó en otro sublinaje independiente cercano a las cepas de referencia de *P. cystidiosus* y *P. djamor*. Dos cepas de “Hongos del Maguey” (CP-525, CP-104) fueron distantes genéticamente del linaje mencionado, aunque no formaron grupos monofiléticos. El resto de las cepas se agrupó de manera mezclada, es decir, los grupos monofiléticos incluyeron cepas de diferentes especies, lo cual sugirió la necesidad de un análisis a mayor profundidad.

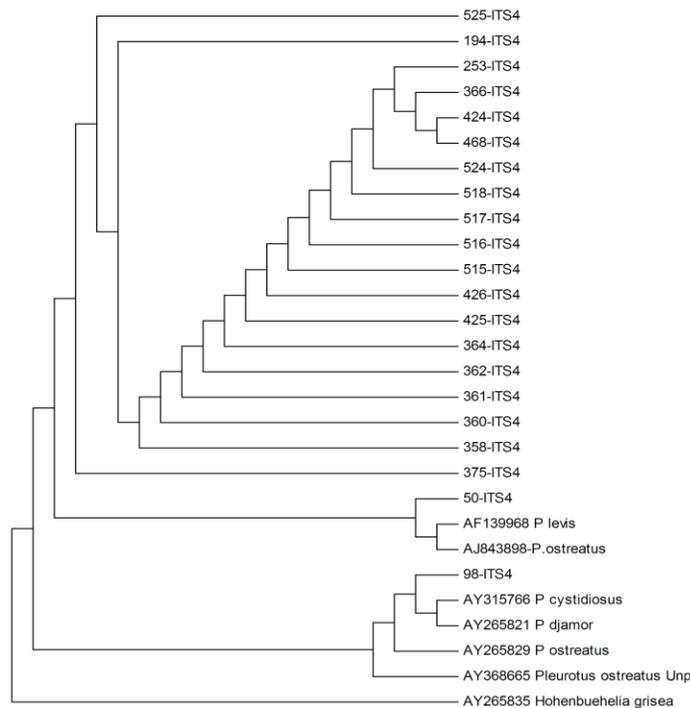


Figura 6.18. Árbol generado por análisis de *Neighbor Joining* de las secuencias ITS1-5.8s-ITS2 de las cepas de *Pleurotus* estudiadas y aquellas de referencia. La suma de las longitudes de las ramas en el árbol óptimo resultó de 6.02951674. Los códigos de cada cepa corresponden al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC), o al banco de datos del *European Bioinformatics Institute* (Gene Bank: **EBML-EBI**; www.ebi.ac.uk/).

Matriz de distancias		CEPAS																																	
CEPAS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28						
525	[1]																																		
50	[2]	0.2																																	
98	[3]	2.1	2.4																																
194	[4]	0.0	0.2	2.1																															
253	[5]	0.1	0.2	1.7	0.1																														
358	[6]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1																													
360	[7]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0																												
361	[8]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0																											
362	[9]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0																										
364	[10]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0																									
366	[11]	0.1	0.2	1.7	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1																								
375	[12]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1																							
424	[13]	0.1	0.2	1.7	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1																						
425	[14]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1																				
426	[15]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0																		
468	[16]	0.1	0.2	1.7	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1																	
515	[17]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0																
516	[18]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0														
517	[19]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0												
518	[20]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0											
524	[21]	0.0	0.2	2.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0										
AY315766 P. cystidiosus	[22]	2.6	3.0	0.5	2.6	2.2	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.2	2.6	2.2	2.6	2.6	2.2	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6						
AY368665 P. ostreatus	[23]	1.7	2.2	0.6	1.7	1.9	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.9	1.7	1.9	1.7	1.7	1.9	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	0.3						
AY265835 Hohenbuehelia	[24]	1.7	2.2	0.9	1.7	1.8	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.8	1.7	1.8	1.7	1.7	1.8	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	0.6	0.5					
AF139968 P. levis	[25]	2.7	2.5	2.2	2.7	3.0	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	3.0	2.7	3.0	2.7	2.7	3.0	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.4	1.9	7.4							
AJ843898 P. ostreatus	[26]	1.7	1.7	2.4	1.7	1.8	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.8	1.7	1.8	1.7	1.7	1.8	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	2.2	2.1	3.1	1.7			
AY265821 P. djanor	[27]	2.2	2.6	0.3	2.2	2.3	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.3	2.2	2.3	2.2	2.2	2.3	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	0.5	0.5	0.8	2.4	2.4		
AY265829 P. ostreatus	[28]	1.9	2.5	0.6	1.9	2.2	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	2.2	1.9	2.2	1.9	1.9	2.2	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	0.2	0.0	0.5	1.7	2.2	0.5

Figura 6.19. Matriz de distancia genética generada por el método de *Neighbor-Joining* mediante el programa MEGA4.

Las similitudes y relaciones genéticas entre las cepas estudiadas se establecieron por el método de Nei (1976). El valor que se obtuvo de las distancias genéticas entre las cepas varió entre 0.0 a 3.1.

El análisis de las secuencias de la región ITS del ADNr demostró una amplia diversidad genética en las cepas estudiadas de los “Hongos del Maguey”. Se lograron identificar cinco grupos monofiléticos independientes, los cuales se muestran en la Figura 6.18. El Grupo I incluyó las cepas CP-358, CP-360, CP-361, y CP-515, todas ellas procedentes del Estado de Puebla. El Grupo II estuvo conformado por las cepas CP-98, CP-359 y CP-364 de los Estados de

Puebla e Hidalgo. En el Grupo III se integró el mayor número de cepas (8): CP-194, CP-365, CP-375, CP-376, CP-426, CP-460, CP-516 y CP-525. Este grupo fue interesante porque incluyó cepas procedentes de varios Estados de la región central de México, tales como Guerrero, Morelos, Puebla y Tlaxcala. El Grupo IV incluyó las cepas CP-363, CP-373, y CP-517 de los Estados de Morelos y Puebla. Finalmente, el Grupo V incluyó las cepas CP-366 y CP-424 de los Estados de Puebla y Morelos, respectivamente, las cuales se agruparon con tres cepas de referencia de *P. djamor*, indicando cercanía genética. El resto de las cepas de “Hongos del Maguey” (4) no se integraron a ningún grupo monofilético, constituyendo líneas independientes (CP-362, CP-425, CP-518, CP-524). Las cepas de referencia de *P. ostreatus* se integraron independientemente en otro grupo monofilético.

Los resultados obtenidos en el análisis molecular coincidieron en general con el estudio preliminar de los “Hongos del Maguey” realizado por Huerta *et al.* (2010). Considerando la mayor diversidad genética analizada en este estudio, puede concluirse que los “Hongos del Maguey” pertenecen a una especie independiente de los taxa descritos hasta ahora dentro del género *Pleurotus*, ya que constituyen cuando menos cinco grupos monofiléticos independientes y con amplia distancia genética del resto de las especies. Uno de estos grupos (V), sin embargo, parece estar filogenéticamente relacionado con *P. djamor*, una especie bastante común en las zonas tropicales y subtropicales de México (Huerta *et al.*, 2010). Por ello, es importante desarrollar pruebas de compatibilidad genética entre los cinco subgrupos filogenéticos de los “Hongos del Maguey”, así como estos con el resto de los 15 grupos interestériles hasta ahora descritos para el género *Pleurotus* (Vilgalys *et al.*, 1996). Esto demostrará si los “Hongos del Maguey” constituyen una especie genéticamente aislada, interestéril con resto de las especies, a partir del concepto biológico de especie.

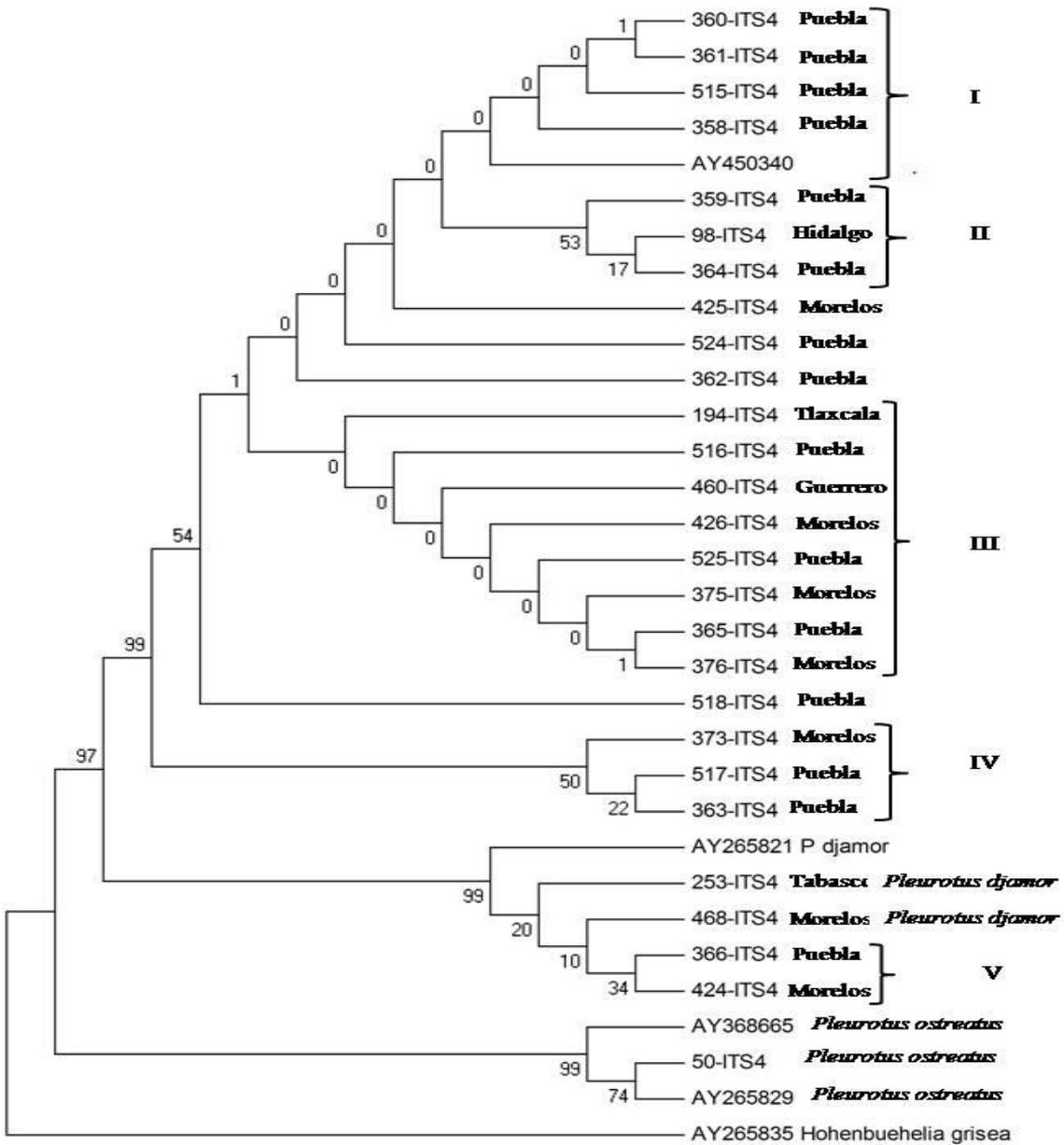


Figura 6.20. Árbol consenso generado por el análisis de máxima parsimonia, analizando las secuencias ITS1-5.8s-ITS2 de las cepas de *Pleurotus* estudiadas y aquellas de referencia. Índices del árbol: Índice de consistencia (CI)= 0.846154 e índice de retención (RI)= 0.935484. Los valores de *bootstrap* se muestran arriba de las ramas (1,000 réplicas). Los códigos de cada cepa corresponden al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC), o al banco de datos del *European Bioinformatics Institute* (Gene Bank: EBML-EBI; www.ebi.ac.uk/).

6.2. Caracterización de las cepas de *Trichoderma*

6.2.1. Caracterización microscópica y macroscópica micelial

Se inició con 23 cepas de “mohos verdes” contaminantes de cultivos de hongos comestibles (Tabla 6.18- 6.19), de los cuales se seleccionaron aquellos identificados como pertenecientes al género *Trichoderma* (Tabla 6.20).

Tabla 6.18. Caracterización macroscópica y microscópica general de “mohos verdes” contaminantes de cultivos de hongos comestibles.

Código	Macroscopía	Microscopía	Identificación preliminar
M-3	 Gran cantidad de esporas verde oscuro, micelio blanco	 Micelio septado, esporas esféricas, conidióforos en racimos y conidios en cadena	<i>Penicillium</i>
M-4	 Micelio blanco y esporas verde oscuro.	 Esporas ovaladas (4 x 2 μm), fiálides ligeramente globosas en la base, en racimos.	<i>Penicillium</i>
M-7	 Micelio blanco, lanoso, costroso.	 Gran cantidad de clamidosporas (6-8 μm), micelio delgado, septado. Fiálides en racimos, con conidios en cadena.	<i>Penicillium</i>
M-31	 Esporas verde claro a oscuras, con micelio blanco aterciopelado.	 Micelio delgado (2μm), septado, esporas ovaladas abundantes (4 x 2 μm).	Deuteromycotina
M-34	 Micelio blanco, aterciopelado.	 Micelio septado de 7 μm de grosor, gran cantidad de clamidosporas terminales e interhifales (10μm).	Deuteromycotina
M-37	 Micelio blanco, con esporas verde oscuro.	 Micelio septado, delgado, con esporas dispuestas en racimos.	-
M-38	 Micelio blanco, con esporas verdes abundantes.	 Presencia de fiálides en conidióforos	<i>Trichoderma</i>
M-39	 Micelio blanco, ceroso.	 Micelio septado delgado, con clamidosporas, y estructuras apicales en forma de pera.	Deuteromycotina
M-43	 Micelio blanco, lanoso	 Micelio septado con clamidosporas, conidios globosos en forma de pera.	Deuteromycotina

Tabla 6.19. Caracterización macroscópica y microscópica general de cepas de “mohos verdes” contaminantes de cultivos de hongos comestibles.

Código	Macroscopía	Microscopía	Identificación preliminar
M-51	 Micelio blanco, con esporas crema		Deuteromycotina
M-57	 Micelio blanco, esporas verdes abundantes		Deuteromycotina
M-64	 Micelio blanco crema, esporas verde-oscuro.		<i>Aspergillus</i>
M-66	 Micelio blanco, esporas verde claro abundantes.		Deuteromycotina
M78	 Micelio lanoso, verdoso con esporas abundantes.		-
M89	 Micelio blanco, lanoso a ligeramente algodonoso.		Deuteromycotina
M103	 Micelio blanco, con esporas verdes abundantes.		<i>Trichoderma</i>
M108	 Micelio blanco lanoso, esporas verde oscuro escasas.		<i>Trichoderma</i>
M109	 Micelio blanco aterciopelado, con esporas verde claro.		<i>Trichoderma</i>
M110	 Micelio blanco lanoso, con esporas verde claro.		<i>Trichoderma</i>
M111	 Micelio blanco, esporas verde limón a verde oscuro abundantes.		<i>Trichoderma</i>
M112	 Micelio blanco, esporas verde oscuro y algunas amarillo verdoso, abundantes.		<i>Trichoderma</i>
M113	 Micelio blanco, con esporas verde oscuro, abundantes.		-
Tr G	 Micelio blanco, algodonoso, esporas amarillo limón a verde oscuras.		<i>Trichoderma</i>

Las cepas de *Trichoderma* seleccionadas pertenecieron a cinco Estados del país: México, Durango, Puebla, Veracruz y Guanajuato. Se encontraron asociadas a cuatro cultivos de hongos comestibles: *Agaricus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., y *Ganoderma* spp. Después de realizar la caracterización macroscópica y microscópica, se lograron identificar doce cepas como pertenecientes al género *Trichoderma* (**Figura 6.21**), y dos como afines a *Trichoderma* (**Tabla 6.20**).

Tabla 6.20. Cepas seleccionadas tentativamente pertenecientes al género *Trichoderma*, aisladas de muestras de substrato contaminado procedente de plantas productoras de hongos comestibles de diversos Estados del país. Las cepas están depositadas en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC) del COLPOS, Campus Puebla.

Código	Especie	Origen (Estado)	Cultivo asociado
CPM-37	<i>Hypocrea</i> sp.	Puebla	<i>Lentinula edodes</i>
CPM-38	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> Samuels & W. Gams	México	<i>Lentinula edodes</i>
CPM-78	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	Puebla	<i>Lentinula edodes</i>
CPM-103	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Durango	<i>Pleurotus</i>
CPM-108	<i>Trichoderma</i>	Puebla	<i>Ganoderma</i>
CPM-109	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> Samuels & W. Gams	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-110	<i>Hypocrea</i> sp.	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-111	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-112	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-113	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Veracruz	<i>Agaricus</i>
CPM-114	<i>Trichoderma</i>	Puebla	<i>Ganoderma</i>
CPM-115	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	Guanajuato	<i>Pleurotus</i>
CPM-116	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Donación	-
CPM-117	<i>Trichoderma</i> sp.	Donación	-

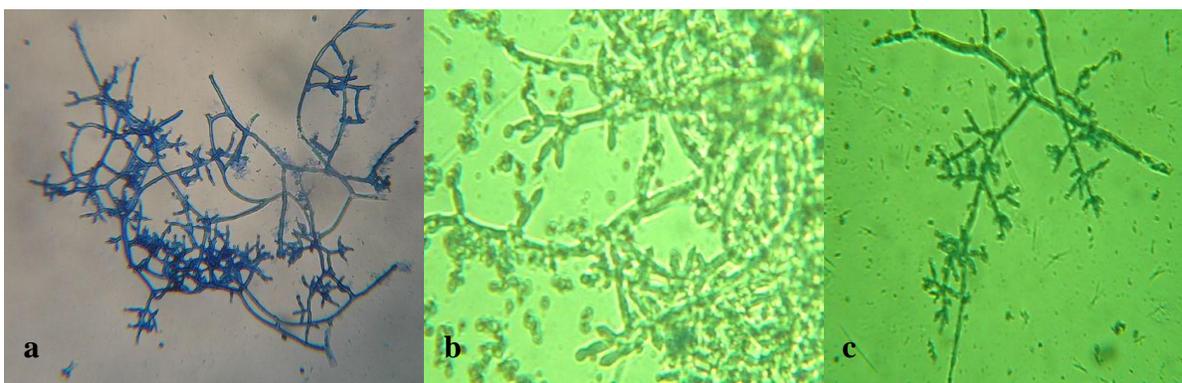


Figura 6.21. Fiálides de *Trichoderma* de las cepas: **a:** CPM-109. **b:** CPM-110. **c:** CPM-112.

6.2.2. Determinación de la tasa de desarrollo

Las cepas de *Trichoderma* (Tabla 6.20) que presentaron la mayor tasa de desarrollo sin diferencia significativa en PDA fueron: CPM-108 (25.3±0.46 mm/día), CPM-37 (24.4±0.79 mm/día), CPM-103 (24.2±0.36 mm/día), CPM-38 (23.6±0.93 mm/día), CPM-112 (22.6±0.67 mm/día), CPM-78 (22.2±2.38 mm/día) y CPM-111 (20.6±1.19 mm/día). La cepa con la tasa de desarrollo más baja fue la CPM-110 (14.9±1.55 mm/día). La tasa de desarrollo en el medio EMA para las mismas cepas de *Trichoderma* fue alta en las cepas CPM-37 (23.5±1.20 mm/día), CPM-38 (22.1±2.14 mm/día), CPM-103 (21.8±0.80 mm/día), CPM-111 (20.7±0.63 mm/día), CPM-108 (20.6±3.21 mm/día), y CPM-109 (20.5±1.77 mm/día).

Tabla 6.21. Tasa de desarrollo (TD ± error estándar) de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas, las cuales fueron aisladas de plantas productoras de hongos comestibles. Condición de incubación: 28°C.

Cepa	Tasa de desarrollo (mm/día)*					
	PDA		CYM		EMA	
CPM-38	23.6	±0.93 fghijk	22.1	±1.04 cdefghijk	22.1	±2.14 cdefghijk
CPM-103	24.2	±0.36 hijk	23.0	±1.08 efghijk	21.8	±0.80 cdefghijk
CPM-108	25.3	±0.46 k	25.1	±1.10 jk	20.6	±3.21 cdefghijk
CPM-109	16.9	±1.50 abcdefg	17.1	±0.59 abcdefgh	20.5	±1.77 cdefghijk
CPM-111	20.6	±1.19 cdefghijk	19.7	±0.93 bcdefghijk	20.7	±0.63 cdefghijk
CPM-112	22.6	±0.67 defghijk	16.8	±0.79 abcdefg	19.5	±0.38 bcdefghijk
CPM-110	14.9	±1.55 abc	11.9	±0.34 a	11.9	±0.81 a
CPM-114	17.4	±0.24 abcdefghi	23.9	±0.27 ghijk	16.2	±1.07 abcde
CPM-37	24.4	±0.79 ijk	25.3	±0.38 k	23.5	±1.20 fghijk
CPM-78	22.2	±2.38 defghijk	25.4	±2.57 k	17.3	±1.51 abcdefghi
CPM-113	17.4	±0.44 abcdefghi	18.7	±0.54 abcdefghijk	19.1	±0.66 abcdefghijk
CPM-117	15.6	±3.18 abcd	18.7	±0.20 abcdefghijk	18.7	±0.59 abcdefghijk
CPM-116	17.3	±0.60 abcdefghi	18.1	±0.35 abcdefghij	12.8	±0.82 ab
CPM-115	15.4	±0.54 abcd	16.7	±1.52 abcdefg	16.5	±0.29 abcdef

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

La tasa de desarrollo en el medio CYM de las cepas de *Trichoderma* resultó ser alta en las cepas CPM-78 (25.4±2.56 mm/día), CPM-37 (25.3±0.38 mm/día), CPM-108 (25.1±1.10

mm/día), CPM-114 (23.9 ± 0.27 mm/día), CPM-103 (23.0 ± 1.08 mm/día) y CPM-38 (22.1 ± 1.04 mm/día).

El crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en los tres diferentes medios de cultivo estudiados fue muy similar. Sin embargo, se observó que en el medio con menos nutrientes (PDA), los conidios maduraron más rápido, tornándose a color verde oscuro, aunque se forman en menor cantidad. En EMA, los conidios tardaron un poco más en madurar, amarillentos, con una mayor densidad de estos. Finalmente, en CYM los conidios se produjeron en una cantidad mucho mayor que en PDA y EMA, sin embargo, tardaron más tiempo en madurar, observándose conidios densos blanquecinos a amarillentos (**Figura 6.22**).

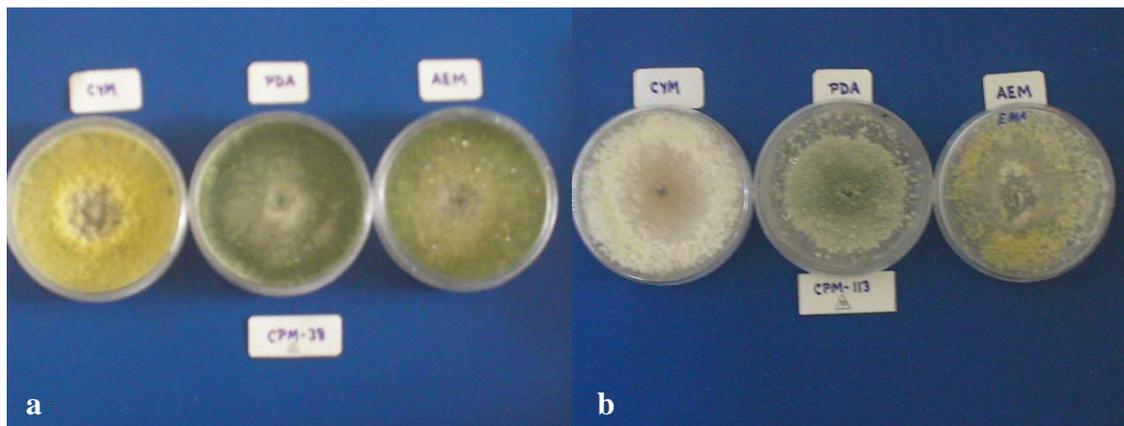


Figura 6.22. Colonias de *Trichoderma* creciendo sobre diferentes medios de cultivo: medio completo con extracto de levadura (CYM), agar con papa y dextrosa (PDA), y agar con extracto de malta (EMA). **a:** CPM-38. **b:** CPM-113.

6.2.3. Eliminación de bacterias asociadas a las cepas de *Trichoderma*

Algunas de las cepas que se aislaron de plantas productoras de hongos comestibles presentaron persistentemente bacterias en el medio de cultivo, asociadas las cepas CPM-103, CPM-109, CPM-37 y CPM-78 de *Trichoderma*. Por ello, se preparó PDA con cloranfenicol (0.1 mg/ml) para hacer subcultivos de las mismas. Un pequeño segmento de las hifas de la periferia de dichas colonias de *Trichoderma* se transfirieron a matraces con medio líquido CYM más cloranfenicol (0.1 mg/ml), este último medio para poder evidenciar de mejor forma la presencia de bacterias.

Sin embargo, cuando las bacterias persistían, se procedió a incrementar la dosis de cloranfenicol a 0.3 mg/ml y 0.5 mg/ml en medio líquido CYM, para después de 48-96 h transferir un inóculo de los mismos a medio líquido CYM sin cloranfenicol para corroborar el cultivo axénico (**Tabla 6.21**).

Tabla 6.22. Evaluación de los tratamientos con cloranfenicol para eliminar las bacterias contaminantes asociadas a los cultivos de *Trichoderma*. (dosis: 0.1, 0.3, 0.5 mg/ml)

Tratamiento	Presencia de bacterias					
	A		B		C	
Cloranfenicol (mg/ml)	0.1	0.0	0.3	0.0	0.5	0.0
Cepa						
CPM37	+	+	-	+	-	-
CPM78	+	+	-	-	-	-
CPM103	+	+	-	+	-	-
CPM109	+	+	-	-	-	-

+ = Presencia de bacterias. - = Ausencia de bacterias.

Se pudo observar que en la cepa CPM-103, durante el proceso de eliminación de las bacterias, su capacidad para producir esporas disminuyó y su desarrollo fue más lento (**Figura 6.23**). Antes de eliminar la contaminación bacteriana, a las 48 h de inoculación en 50 ml de CYM líquido, el micelio saturó el medio y se observó esporas abundantes (**Figura 6.24**). En el restos de las cepas se observó el mismo efecto, pero en diferentes grados.

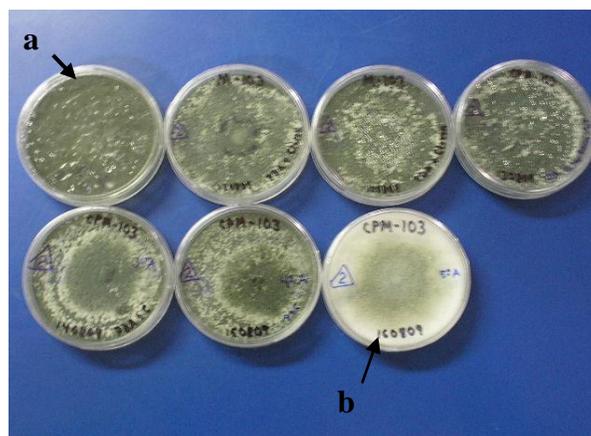


Figura 6.23. Obtención de cultivo puro de *Trichoderma* en agar con papa y dextrosa más cloranfenicol. **a:** Cepa CPM-103 con bacterias. **b:** Cultivo axénico.

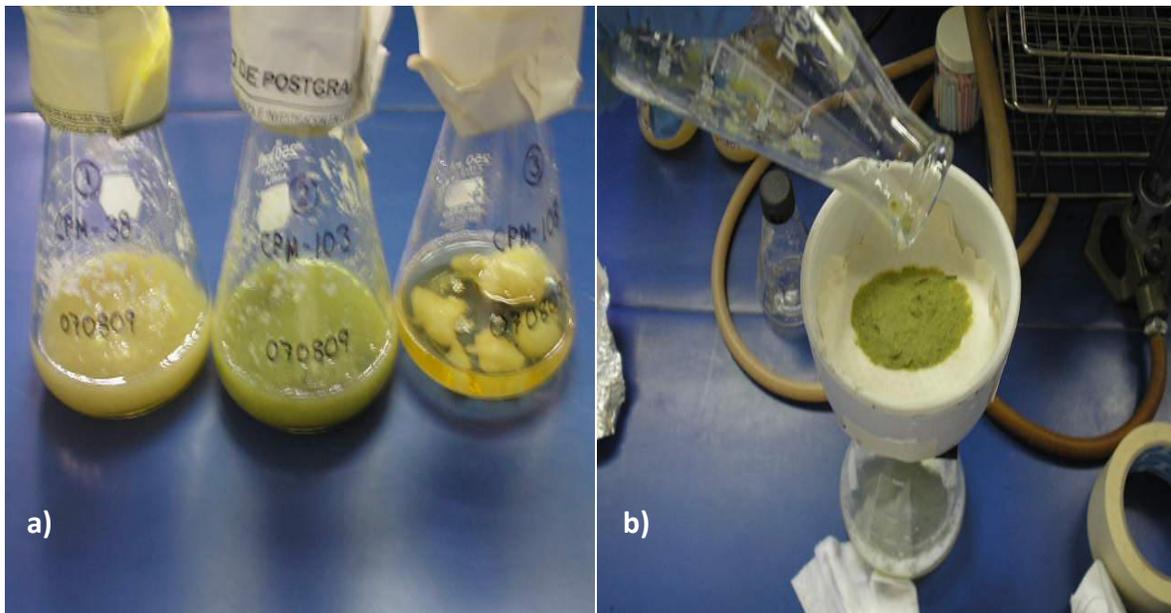


Figura 6.24. Cepa CPM-103 de *Trichoderma* contaminada por bacterias asociadas. **a:** Medio completo líquido con extracto de levadura (CYM), a las 48 h de inoculación con la cepa CPM-103. **b:** Eliminación de la biomasa para evaluar la presencia o ausencia de contaminación bacteriana.

6.2.4. Mantenimiento de las cepas de *Trichoderma*

El mantenimiento de las cepas de *Trichoderma* en medio sólido tiene sus desventajas, ya que a temperatura ambiente es necesario resembrarlas cada dos meses y se requiere contar con un área especial para trabajar con las cepas, por la gran cantidad de esporas que producen. Por tal motivo, las cepas estudiadas se desarrollaron en medio líquido CYM con y sin cloranfenicol, los cuales permitieron mantener las cepas para evaluación de viabilidad hasta 5 y 8 meses (**Tabla 6.22**). Trabajar principalmente micelio resulta ser muy práctico, ya que se puede trabajar en la cámara de flujo, y se puede detectar fácilmente la presencia de bacterias. Por otra parte, se detectó que cada cepa de *Trichoderma* desarrolló *pellets* característicos (**Figura 6.25**), lo que facilita la evaluación de la viabilidad.

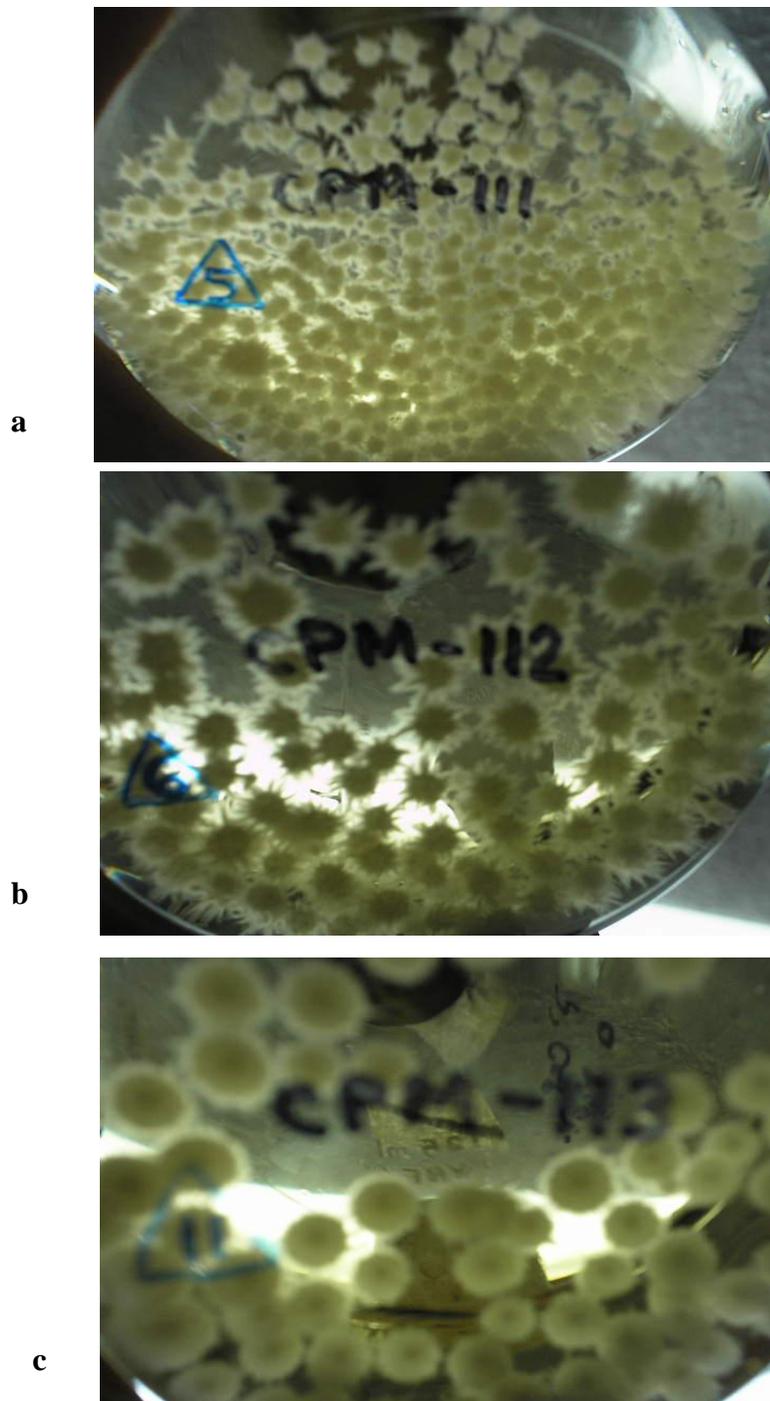


Figura 6.25. Ejemplos de variabilidad de los *pellets* producidos en medio completo líquido con extracto de levadura (CYM) por las cepas de *Trichoderma*: CPM-111 (a), CPM-112 (b), y CPM-113 (c).

Tabla 6.23. Determinación del tiempo de conservación de las cepas de *Trichoderma* tomando *pellets* de matraces con medio completo líquido con extracto de levadura (CYM), con cloranfenicol (MCC) y sin cloranfenicol (MSC). Las cepas se recuperaron en agar con dextrosa y papa (PDA) por 48-96 h a los cinco y ocho meses de conservación.

CEPA	Mes 5			Mes 8	
	MSC	MCC	Recuperación (%)	MSC	Recuperación (%)
CPM-38	+	+	100	+	100
CPM-103	+	+	100	+	100
CPM-108	+	+	100	-	0
CPM-109	+	+	100	-	0
CPM-111	+	+	100	-	0
CPM-112	+	+	100	-	0
CPM-110	+	+	100	+	50
CPM114	+	+	100	+	50
CPM-37	+	+	100	+	100
CPM-78	+	+	100	+	100
CPM-113	+	+	100	+	50

MSC= Matraz con medio líquido sin cloranfenicol, MCC= Matraz con medio líquido con cloranfenicol,

Los resultados obtenidos en la evaluación del tiempo de conservación de las cepas de *Trichoderma* en medio CYM líquido, indicó que el período adecuado de conservación fue de cinco meses, con una viabilidad del 100%.

6.2.5. Análisis molecular de las cepas de *Trichoderma*

Con base en los resultados obtenidos del análisis de secuencias por el método de *Neighbor Joining*, se obtuvo el dendrograma que muestra las distancias genéticas de las cepas estudiadas de *Trichoderma*, junto con las cepas de referencia obtenidas de la base de datos del Instituto de Bioinformática Europea (**Figura 6.26**). Como grupo externo se incluyó a *Fusarium oxysporum*.

El análisis por *Neighbor Joining* demostró que las cepas CPM-38, CPM-103, CPM-109, CPM-111, CPM-112, y CPM-113 corresponden a la especie recientemente descrita de “moho verde” agresivo *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* Samuels & W. Gams. Por su parte, las cepas CPM-37 y CPM-110 se identificaron como *Hypocrea*, fase anamórfica de *Trichoderma*. Por su parte, las cepas CPM-108 y CPM-114 se determinaron como otras especies de *Trichoderma*.

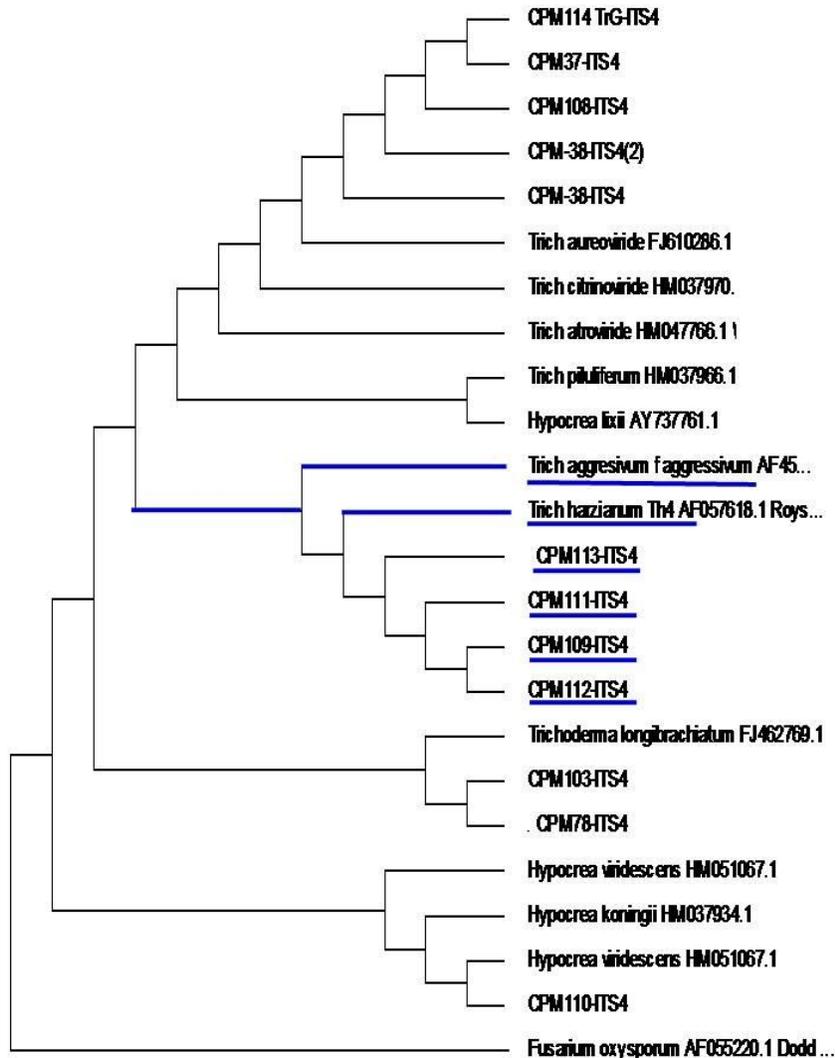


Figura 6.26. Dendrograma de las cepas estudiadas de *Trichoderma*, generado por el método de *Neighbor Joining*, a partir del análisis de las secuencias de la región ITS (ITS1-5.8s-ITS2) del ADNr. Los códigos de cada cepa corresponden al Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC), o al banco de datos del *European Bioinformatics Institute* (Gene Bank: EBML-EBI; www.ebi.ac.uk/).

Considerando los resultados de la tasa de desarrollo y los resultados del dendrograma de *Trichoderma*, se pudo observar que no sólo las cepas de *Trichoderma* agresivas, las cuales causan serios problemas en la producción comercial de hongos, presentan rápida velocidad de crecimiento, sino también otras especies. La tasa de desarrollo de las cepas CPM-108, CPM-37 y CP-M78 fue alta y no presentó diferencias significativas con respecto a las cepas agresivas CPM-109, CPM-111, CPM-112 y CPM-113). Esto demostró que la velocidad de crecimiento no es útil como parámetro único de diagnóstico para identificar las cepas agresivas del “moho verde”.

6.3. Evaluación de la confrontación de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* vs. *Trichoderma*

Del experimento realizado en PDA (controles a pH inicial=5.6 y pH inicial= 11 para *Pleurotus* y *Trichoderma*, y co-cultivos *Pleurotus* vs. *Trichoderma* a pH=5.6 y pH= 11), al día 3 se observó el rápido avance del micelio de la cepa seleccionada de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112), más allá de la mitad de la caja de petri en el medio PDA, pH=5.6, tanto en los controles como en los co-cultivos con las cepas CP-50 de *P. ostreatus*, y CP-363, CP-460 y CP-517 de *P. sp.* Mientras tanto, el desarrollo de las cepas de *Pleurotus* era mínimo aunque el viraje a color azul intenso del medio por la producción enzimática abarcaba hasta $\pm 25\%$ de la caja de petri. Por otro lado, en el tratamiento de PDA, pH=11, no se apreció desarrollo micelial de *Pleurotus*, ni de *Trichoderma*, tanto en los controles como en los co-cultivos (**Figura 6.27, Tabla 6.23**).

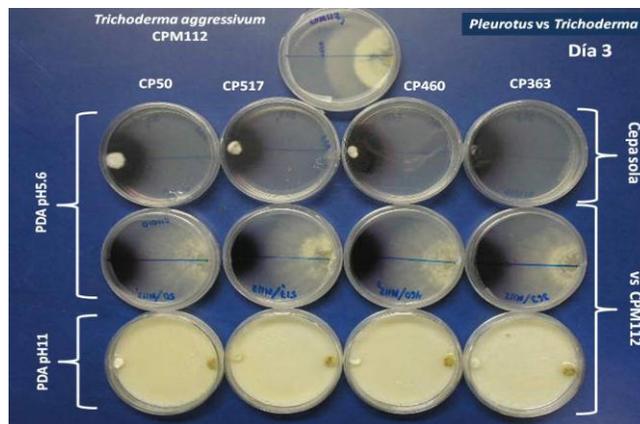


Figura 6.27. Prueba cualitativa de la producción de lacasas al tercer día de inoculación con las cepas seleccionadas de *Pleurotus* en medio de agar con dextrosa y papa (PDA), a un pH inicial de 5.6 y 11, tanto en controles como en los tratamientos. El co-cultivo fue con *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112).

6.3.1. Tasa de desarrollo y halos de producción enzimática de *Pleurotus* y *Trichoderma* en PDA a pH 5.6

La mejor tasa de desarrollo se registró en la cepa comercial CP-50 (1.3 ± 0.2 mm/día) de *P. ostreatus* y la CP-517 (1.0 ± 0.33 mm/día) de *P. sp.*, cuya diferencia no fue estadísticamente significativa. Las cepas CP-460 (0.2 ± 0.08 mm/día) y CP-363 (0.0 ± 0.0 mm/día) de *P. sp.* presentaron menor tasa de desarrollo. Por su parte, las cepas de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*, CPM-112 (9.3 ± 0.05 mm/día) y CPM-113 (7.0 ± 0.05 mm/día) presentaron la mayor tasa de desarrollo, cuya diferencia no fue estadísticamente significativa (**Tabla 6.23**).

Por otra parte, la producción enzimática de lacasas generó un halo azul intenso (HF) en las cepas de *Pleurotus*, un poco menor en el “Hongo del Maguey” (*P. sp.*: CP-460: 13.7 ± 0.33 mm), en comparación con la cepa comercial CP-50 de *P. ostreatus* (17.0 ± 0.57 mm), aunque la diferencia no fue significativa. Este también fue el caso del halo azul débil entre ambas cepas estudiadas (**Tabla 6.24**). No se observó ningún halo en las cepas de *Trichoderma*.

Tabla 6.24. Tasa de desarrollo y halo enzimático de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6) de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* y *Trichoderma* (controles). Evaluación al tercer día de la inoculación.

Especie	Cepa	TD \pm EE (mm/día)		Halo enzimático (mm)	
				HF \pm EE	HD \pm EE
<i>P. ostreatus</i>	CP-50	1.3 \pm 0.20	b	17.0 \pm 0.57	b 20.8 \pm 0.72 a
<i>P. sp.</i>	CP5-17	1.0 \pm 0.33	b	13.0 \pm 1.52	a 17.7 \pm 1.20 a
<i>P. sp.</i>	CP-460	0.2 \pm 0.08	a	13.7 \pm 0.33	ab 19.0 \pm 0.00 a
<i>P. sp.</i>	CP-363	0.0 \pm 0.00	a	13.0 \pm 0.33	a 19.0 \pm 0.57 a
<i>T. aggressivum f. aggressivum</i>	CPM-112	9.3 \pm 0.05	c	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
<i>T. aggressivum f. aggressivum</i>	CPM-113	7.0 \pm 0.05	c	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

TD= Tasa de desarrollo. HF= Halo enzimático fuerte. HD= Halo enzimático débil.

En el caso de los co-cultivos, las cepas de *Pleurotus* en general presentaron una menor tasa de desarrollo en comparación con los controles, mientras que la cepa de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* se mantuvo en el mismo nivel de desarrollo. Entre los co-cultivos CP-50 vs. CPM-112 (0.66 ± 0.0 mm/día) y CP-517 vs. CPM-112 (0.44 ± 0.1 mm/día) no se

encontró diferencia significativa, mientras que el desarrollo de la cepa CP-460 en el co-cultivo fue menor (0.33 ± 0.0 mm/día; CP-460 vs. CPM-112) y estadísticamente diferente a la cepa de referencia control CP-50. Sin embargo, en la producción enzimática no hubo diferencia significativa, ni en la formación del halo fuerte (CP-50, 14.0 ± 0.6 mm; CP-460, 12.66 ± 0.3 mm), ni del halo débil (CP-50, 18.8 ± 0.6 mm; CP-460, 17.6 ± 0.6 mm), Por otra parte, debe destacarse que la cepa CP-363 en el co-cultivo no presentó desarrollo del micelio (CP-363 vs. CPM-112); sin embargo, si se observó producción enzimática, la cual fue estadísticamente similar a la expresada por la cepa comercial (**Tabla 6.24; Figura 6.28**).

Tabla 6.25. Tasa de desarrollo y halo enzimático de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6) de los co-cultivos entre las cepas seleccionadas de *Pleurotus* vs. *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (controles). Evaluación al tercer día de la inoculación.

Especie	Cepas	TD (mm/día)		Halo enzimático (mm)	
		P	T	HF	HD
<i>P. ostreatus</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-50 vs. CPM-112	0.66 c	10.00 a	14.0 b	18.83 b
<i>P. sp.</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-517 vs. CPM-112	0.44 bc	9.22 a	11.33 a	16.33 a
<i>P. sp.</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-460 vs. CPM-112	0.33 b	9.22 a	12.66 ab	17.66 ab
<i>P. sp.</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-363 vs. CPM-112	0.0 a	10.0 a	13.0 ab	18.0 ab

P= *Pleurotus*. T= *Trichoderma*. HF= Halo enzimático fuerte. HD= Halo enzimático débil.

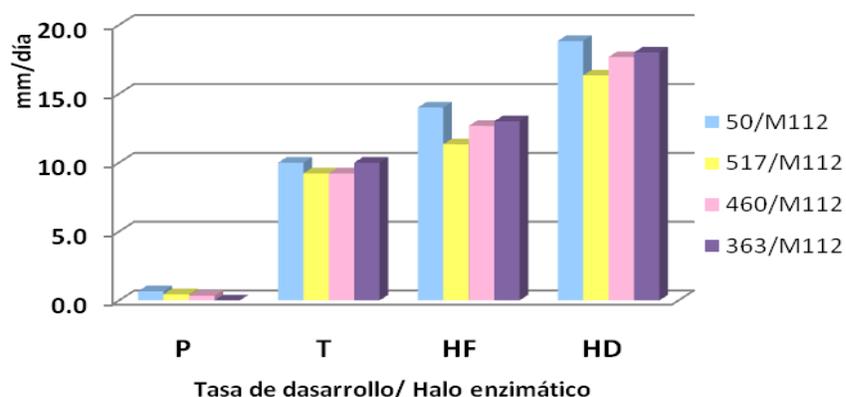


Figura 6.28. Comparación de la tasa de desarrollo de los co-cultivos entre las cepas seleccionadas de *Pleurotus* vs. *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112) en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al tercer día de la inoculación.

Se observó resistencia natural de los “Hongos del Maguey” al ataque de la cepa CPM-112 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*, ya que su crecimiento radial se limitó al acercarse a la zona del halo de producción enzimática de *Pleurotus*. Este comportamiento se presentó con todas las cepas, aunque fue más evidente en los “Hongos del Maguey”, principalmente la cepa CP-460 (14.2 ± 0.6 mm) y CP-517 (12.5 ± 0.3 mm), las cuales mostraron una mayor limitación en relación con la cepa de referencia CP-50 (9.6 ± 0.6 mm) [Tabla 6.25; Figura 6.29].

Tabla 6.26. Distancia limitante de confrontación (DLC) en los co-cultivos entre las cepas seleccionadas de *Pleurotus* vs. *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-112) en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto día de la inoculación.

Especie	Cepas	± EE
		DLC (mm)
<i>P. ostreatus</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-50 vs. CPM-112	9.6 ± 0.6 a
<i>P. sp.</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-517 vs. CPM-112	12.5 ± 0.3 bc
<i>P. sp.</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-460 vs. CPM-112	14.2 ± 0.6 c
<i>P. sp.</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-363 vs. CPM-112	10.7 ± 0.3 ab

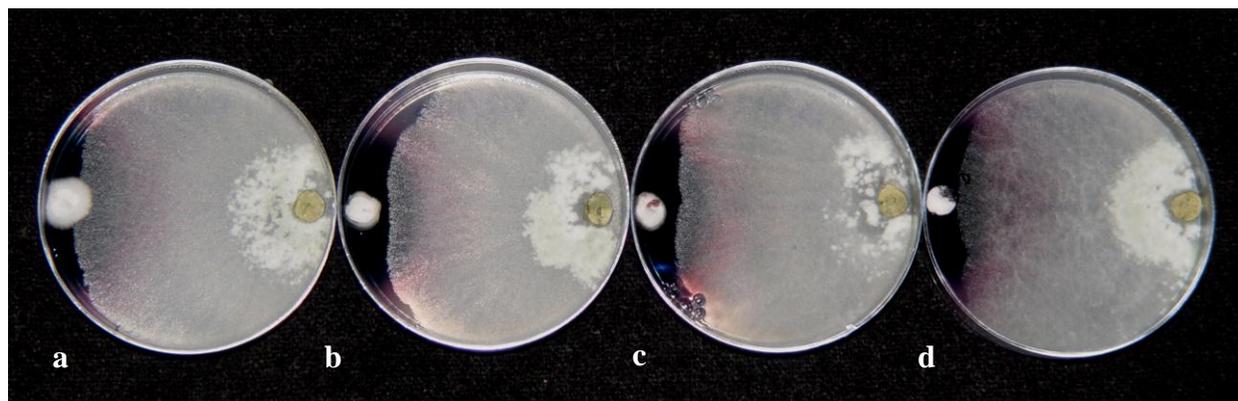


Figura 6.29. Respuesta diferenciada de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* al confrontarse con *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-112), las cuales muestran el halo de producción enzimática de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto día de la inoculación. **a:** CP-50 vs. CPM-112. **b:** CP-517 vs. CPM-112. **c:** CP-460 vs. CPM-112. **d:** CP-363 vs. CPM-112.

6.3.2. Esporulaci3n de *Trichoderma* (CPM-112) en los co-cultivos con *Pleurotus*

La formaci3n de esporas de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* en los co-cultivos fue marcadamente menor en presencia de las cepas estudiadas de *Pleurotus*, en las denominadas Zona 1 y 2 (Zona 1: 400,000- 2,925,000 conidiosporas/ml; Zona 2: 100,000-350,000 conidio/ml), con respecto al control de *Trichoderma* que present3 un n3mero de 4,025,000 esporas/ml en la Zona 1, y 4,025,000 esporas/ml en la Zona 2 (Tabla 6.27; Figura 6.35 y 6.36).

Tabla 6.27. An3lisis comparativo de la esporulaci3n (n3mero de conidiosporas \pm error est3ndar) de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-112) en tres zonas de muestreo de los co-cultivos con las cepas seleccionadas de *Pleurotus* en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto d3a de la inoculaci3n.

Especie	Cepa	Zona 1	Zona 2	Zona 3
<i>P. ostreatus vs. Trichoderma</i>	CP-50 vs. CPM-112	2,925,000 \pm 153885.0 c	300,000 \pm 33333.3 a	0
<i>P. sp. vs. Trichoderma</i>	CP-517 vs. CPM-112	1,825,000 \pm 123884.0 b	125,000 \pm 41666.7 a	0
<i>P. sp. vs. Trichoderma</i>	CP-460 vs. CPM-112	400,000 \pm 66666.0 a	100,000 \pm 40824.8 a	0
<i>P. sp. vs. Trichoderma</i>	CP-363 vs. CPM-112	2,125,000 \pm 93169.5 b	350,000 \pm 76376.3 a	0
<i>T. aggressivum f. aggressivum</i>	CPM-112	4,025,000 \pm 228066.0 d	4,025,000 \pm 245657.0 a	0

*= Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las medias, de acuerdo a la Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

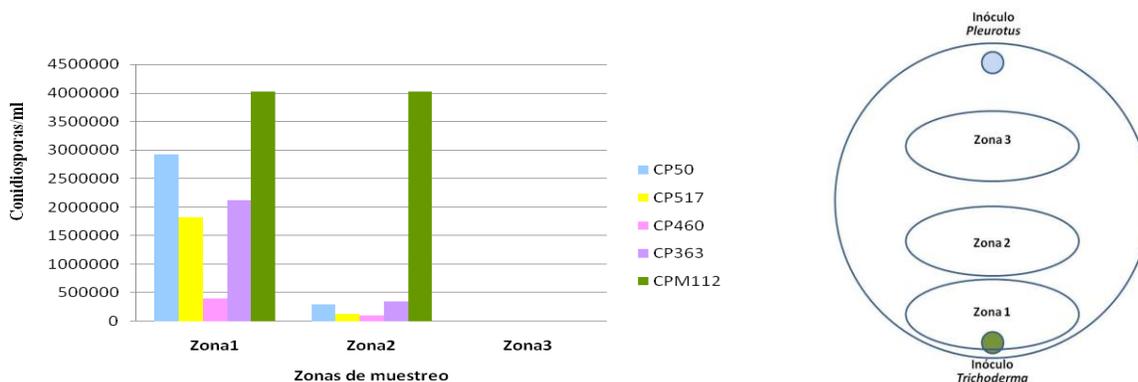


Figura 6.30. Esporulaci3n de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-112) en tres zonas de muestreo de los co-cultivos con las cepas seleccionadas de *Pleurotus* en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto d3a de la inoculaci3n.

Por otra parte, al microscopio estereoscópico, también se observó una menor densidad micelial de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-112) al establecer contacto con los “Hongos del Maguey”, lo cual indicó una respuesta diferenciada a la confrontación con las cepas seleccionadas de *Pleurotus* y que requiere un estudio a mayor profundidad.

6.3.3. Tasa de desarrollo y halos de producción enzimática de *Pleurotus* y *Trichoderma* en PDA a pH 11

Al estudiar la tolerancia de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* a condiciones extremas de pH inicial 11, en este experimento creció la cepa CP-460 de “Hongos del Maguey” a una tasa de desarrollo de 1.1 mm/día (Tabla 6.28), aunque las cepas CP-50 y CP-517 mostraron halos de producción enzimática de lacasas indicando un desarrollo mínimo. El pH del medio PDA a los 18 días de la inoculación fue diferente entre las cepas (CP-50: 8.31; CP-460: 8.32; CP-517: 8.38) [Figura 6.31].

Tabla 6.28. Tasa de desarrollo y halo enzimático de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH inicial= 11) de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* (tratamiento). Evaluación al día 18 de la inoculación.

Especie	Cepa	TD (mm/día)	Halo enzimático (mm)		pH del PDA, día 18
			HF	HD	
<i>P. ostreatus</i>	CP-50	0.0	0.0	7.0	8.31±0.0 a
<i>P. sp.</i>	CP-517	0.0	7.0	14.0	8.38±0.0 b
<i>P. sp.</i>	CP-460	1.1	27.0	35.0	8.32±0.1 a
<i>P. sp.</i>	CP-363	0.0	0.0	0.0	-
<i>T. aggressivum f. aggressivum</i>	CPM-112	0.0	0.0	0.0	-
<i>T. aggressivum f. aggressivum</i>	CPM-113	0.0	0.0	0.0	-

TD= Tasa de desarrollo. HF= Halo enzimático fuerte. HD= Halo enzimático débil.



Figura 6.31. Halo de producción enzimática de las cepas seleccionadas de *Pleurotus*, CP-50 (izquierda), CP-517 (centro) y CP-460 (derecha), sometidas a una condición extrema en agar con dextrosa y papa con pH 11, a 18 días de la inoculación.

6.3.4. Tasa de desarrollo y halos de producción enzimática de *Pleurotus* y *Trichoderma* en PDA a pH 5.6 y 11 (segundo experimento)

En este experimento el halo de producción enzimática de lacasas fue menor en los co-cultivos *Pleurotus* y *Trichoderma* a pH 5.6, en relación a los controles pH5.6. La cepa CP-517 creció mejor en la condición extrema de pH 11, con una tasa de desarrollo de 2.0 mm/día en la cepa sola y de 2.92 mm/día en el co-cultivo *Pleurotus* y *Trichoderma* (**Figura 6.32**). Por su parte, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* fue incapaz de desarrollarse en la condición extrema de pH 11 (**Tabla 6.29; Figura 6.33**). Una observación importante fue que la cepa seleccionada CP-517 de “Hongos del Maguey” fue capaz de crecer después de la confrontación con *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (PDA, pH=5.6), lo cual indicó una respuesta diferenciada de las cepas de *Pleurotus* (**Figura 6.34**).

Tabla 6.29. Tasa de desarrollo y halo enzimático de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH inicial= 5.6 y 11) de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* y su confrontación con *Trichoderma aggressivum . aggressivum* (controles y tratamientos). Evaluación al día 13 de la inoculación.

Condición	Cepa	P	T	Halo enzimático (mm)	
		TD (mm/día)	TD (mm/día)	HF	HD
Control pH 5.6	CP-50	2.46	-	38.0	50.0
	CP-517	2.84	-	52.0	60.0
	CP-460	2.69	-	30.0	42.0
	CPM-112	9.30	-	0.0	0.0
Co-cultivo pH 5.6	CP-50 vs. CPM-112	0.23	10.0	20.0	35.0
	CP-517 vs. CPM-112	0.30	9.6	21.0	35.0
	CP-460 vs. CPM-112	0.07	9.2	25.0	30.0
Control pH 11	CP-50	0.46	-	20.0	28.0
	CP-517	2.00	-	30.0	37.0
	CP-460	0.07	-	5.0	14.0
	CPM-112	0.0	-	0.0	0.0
Co-cultivo pH 11	CP-50 vs. CPM-112	0.00	0.0	0.0	0.0
	CP-517 vs. CPM-112	2.92	0.0	42.0	43.0
	CP-460 vs. CPM-112	0.00	0.0	6.0	14.0

TD= Tasa de desarrollo. HF= Halo enzimático fuerte. HD= Halo enzimático débil.

Es importante mencionar que la inducción de lacasas en hongos superiores por microorganismos competidores ha sido considerada como una respuesta de protección al ataque, de acuerdo con Eggert *et al.* (1996), y Collins & Dobson (1997). Los experimentos realizados demostraron respuesta diferenciada de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* al ataque del “moho verde” de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-112), así como a la condición extrema de pH 11, lo cual requiere de un estudio a mayor profundidad.

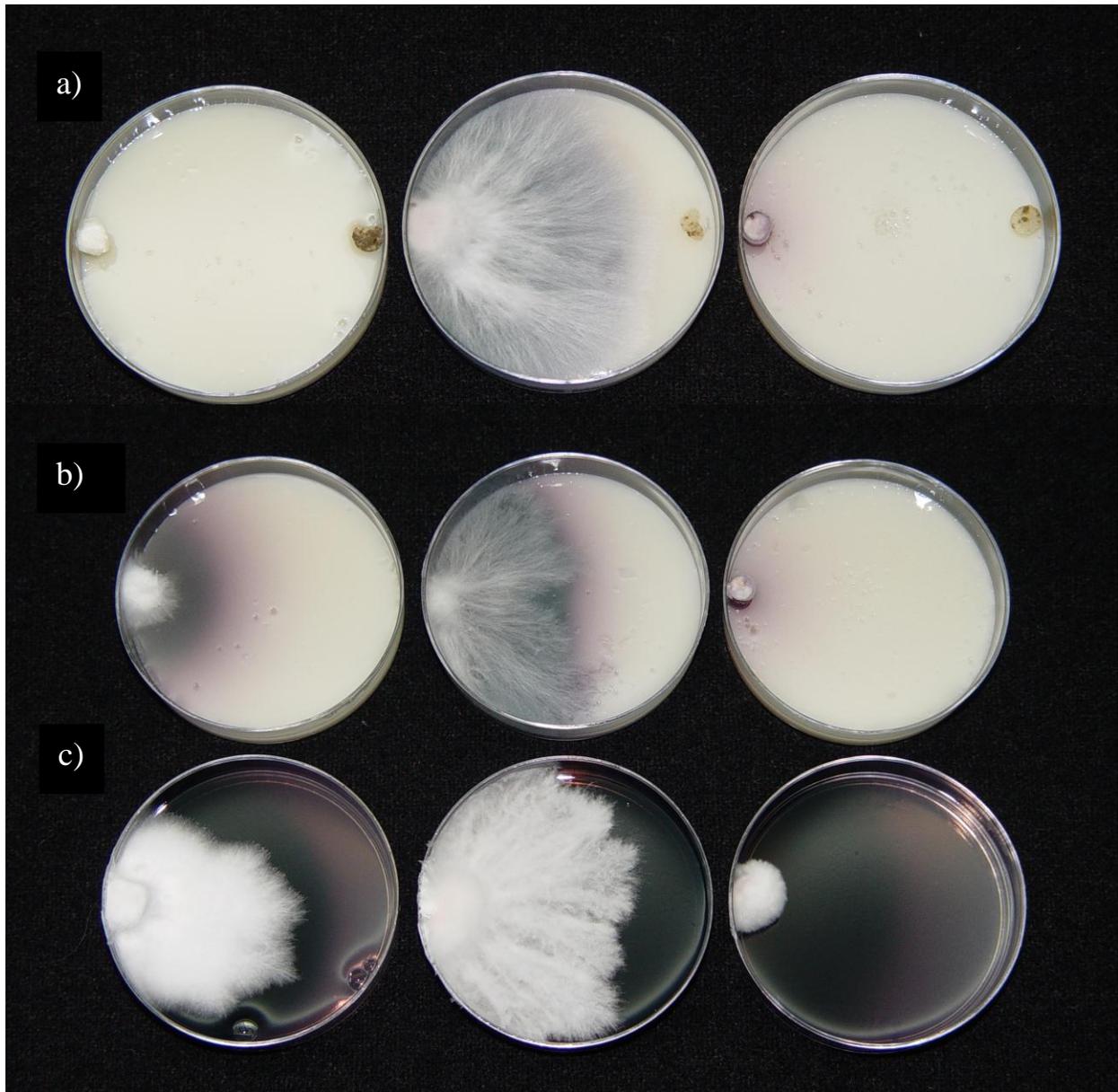


Figura 6.32. Respuesta diferenciada de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* al cultivarse en condición extrema de pH 11, tanto solas como en confrontación con *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112). Tanto en los controles (pH 5.6) como en los tratamientos (pH 11), las colonia muestran el halo de producción enzimática de lacasas en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al día 13 de la inoculación. a: Tratamiento pH 11, co-cultivos CP-50 vs. CPM-112 (izquierda), CP-517 vs. CPM-112 (centro), y CP-460 vs. CPM-112 (derecha). b: Tratamiento pH 11, cultivo de las cepas CP-50 (izquierda), CP-517 (centro), y CP-460 (derecha). c: Control pH 5.6, cultivo de las cepas CP-50 (izquierda), CP-517 (centro), y CP-460 (derecha).

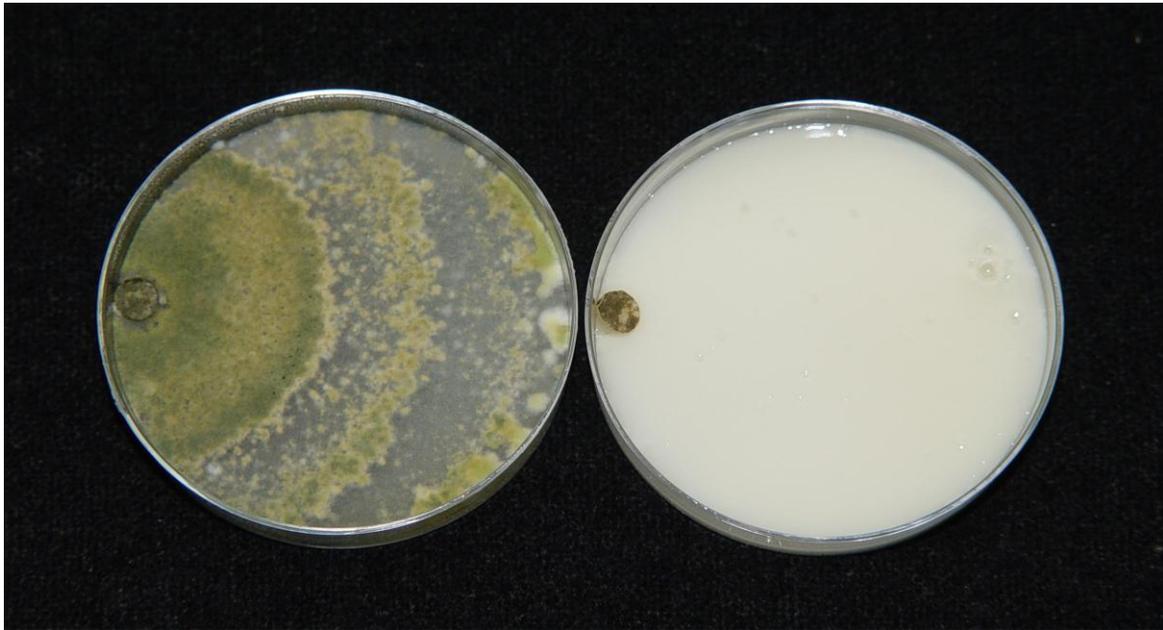


Figura 6.33. Respuesta diferenciada de las cepas del “moho verde” de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112), tanto en el control (pH 5.6, izquierda) como en el tratamiento a condición extrema de pH 11 (derecha), al día 13 de la inoculación en agar con dextrosa y papa (PDA).

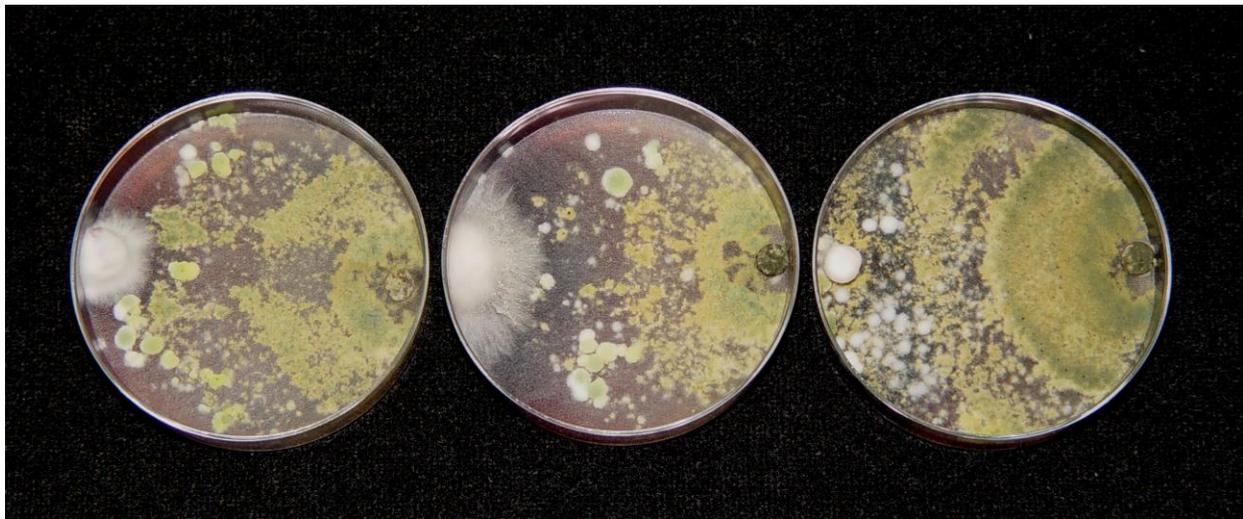


Figura 6.34. Respuesta diferenciada de las cepas seleccionadas de *Pleurotus* (CP-50: izquierda; CP-517: centro; CP-460: derecha), después de la confrontación con las cepas del “moho verde” de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112), al día 13 de la inoculación en agar con dextrosa y papa (PDA; pH 5.6).

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se demostró que los “Hongos del Maguey” corresponden a una nueva especie de *Pleurotus*, hasta ahora endémica del altiplano mexicano, a través del análisis filogenético de la región ITS del ADNr. Dicha especie está conformada por diversas poblaciones que presentan una amplia diversidad genética, a pesar de su limitada distribución geográfica. Se recomienda ampliar la recolección de recursos genéticos, evaluar el conocimiento tradicional de esta especie. y llevar a cabo pruebas de compatibilidad genética con el resto de los 15 grupos interestériles hasta ahora descritos para el género *Pleurotus* (Vilgalys *et al.*, 1996), lo cual confirmará que se trata de una especie genéticamente aislada e interestéril con el resto de los *taxa*, a partir del concepto biológico de especie.
- Las cepas nativas de “Hongos del Maguey” CP-460 y CP-363, por sus características de cultivo y organolépticas, tienen un gran potencial para la producción comercial e incorporación al mercado nacional. Asimismo, ya pueden considerarse para un programa de mejoramiento genético.
- La producción de lacasas es un factor que no está relacionado con la competitividad comercial de las cepas.
- Es factible obtener cepas de *Pleurotus* con características de resistencia genética natural al ataque de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, ya que se observó una respuesta diferenciada en las variables experimentales al estudiar la confrontación de ambos géneros: 1) Tasa de desarrollo, 2) Halo de producción enzimática de lacasas, 3) Distancia limitante de confrontación, 4) Tolerancia a condición extrema de pH, y 5) Producción de conidiosporas.
- Los “Hongos del Maguey” pueden ser aprovechados por las comunidades rurales de México, campesinas e indígenas, tanto en la alimentación como en la generación de ingreso, a través de estrategias adecuadas de transferencia de tecnología.

VIII. ESTRATEGIA PROPUESTA PARA EL APROVECHAMIENTO Y USO DE LOS RECURSOS MICOLÓGICOS DE LAS CEPAS DE *PLEUROTUS* AISLADAS DE MAGUEY

La presente estrategia se plantea los siguientes objetivos, y se esquematiza en la **Figura 8.1**:

- Diversificar las opciones de los productores en cuanto a las cepas que manejen, lo que por una parte a ellos les permitiría elegir la cepa que mejor les convenga por mayor rendimiento, período de producción, y mejor adaptación a las variaciones climáticas y del mercado. Por otra parte, al rotar las cepas de amplia información genética, se podría estar cortando la ruta de transmisión de algunas enfermedades y posiblemente hacer frente a algunas plagas.
- Diversificar las opciones que los productores puedan ofrecer al consumidor en cuanto a propiedades organolépticas y características físicas de los hongos, lo que evitaría que el consumidor opte por otro producto sustituto, e incremente su interés por los nuevos productos.
- Mantener la estabilidad de la producción y del mercado durante todo el año, tomando en cuenta de que las cepas son locales y presentarían una mayor adaptación que las cepas extranjeras, lo que se traduciría en ingresos estables o mayores.
- Llevar un registro del desempeño de las diferentes cepas de acuerdo a los informes de los mismos productores, lo que permitiría saber si es necesario someterlas a un programa de mejoramiento en particular o introducir otras cepas con nuevas características.
- Seguir colectando cepas de *Pleurotus* de maguey, aprovechando que el maguey se desarrolla en la mayoría de los estados del país, es posible que se obtenga un mayor número de cepas que se adapten a un mayor rango de condiciones, y que pueda favorecer a más productores.

8.1. Actores de la estrategia

Con base en todo lo anterior, se consideran los siguientes actores:

1. Los productores a quienes se dirige la estrategia.
2. Los consumidores que finalmente son los que aprueban o desaprueban el producto.
3. El Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla y otras instituciones de investigación sobre la biotecnología de hongos comestibles que mediante sus investigaciones puedan proporcionar a los productores especies alternativas con características diferentes. Asimismo, extender el mercado de la producción de hongos comestibles hacia nuevos sectores de la población, atendiendo las necesidades locales de la cadena producción –consumo, proporcionando la "semilla" micelial a los productores, para que puedan asegurar una producción nacional estable con diferentes alternativas de cepas.
4. El sector Gobierno, a través de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Fundaciones PRODUCE y otros organismos que están en posibilidades de brindar apoyos técnicos, financieros y administrativos a los productores de hongos comestibles.

8.2. El sujeto social de la estrategia

Entre las principales preocupaciones de los pequeños y medianos productores rurales de hongos comestibles al comercializar su producto fresco está el poder cubrir la demanda del mercado en el tiempo, frecuencia, cantidad y calidad requeridos, razones por las cuales, estos productores podrían conformar un sujeto social, ya que serían los principales beneficiarios de los apoyos y gestiones institucionales. Su adecuada organización es fundamental para poder cubrir las necesidades del mercado nacional, e incluso aquellas del mercado internacional.

8.3. Estrategia de manejo y aplicación de las cepas de *Pleurotus* de maguey

Las instituciones de investigación que pueden sugerir una estrategia de manejo y aplicación de las cepas de *Pleurotus* de maguey, estudiando horizontalmente su adaptación a las diferentes condiciones climáticas anuales y a las distintas regiones demandadas por los productores rurales. De este modo, se puede aplicar y recomendar la cepa más adecuada para cada región.

Así, de las cepas de *Pleurotus* de maguey caracterizadas en el presente estudio, de las cepas CP-460 y CP-363, se determinaría su productividad en diferentes regiones del centro del país. De esta forma se plantea la evaluación a nivel de campo de las cepas más competitivas que se obtuvieron en este trabajo de acuerdo a las evaluaciones de TD y de los parámetros que evaluarían la competitividad comercial.

A través de la estrategia de cultivo rural de hongos comestibles (Martínez-Carrera, 2002), se elaborarán las unidades de producción en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, con las cepas seleccionados a nivel módulo experimental. Cuando las unidades hayan sido colonizadas en su totalidad, se distribuirán de forma aleatoria a productores de hongos comestibles de las comunidades en cuestión, de acuerdo con un diseño experimental. Se evaluará la aceptación de las cepas como una opción en su cultivo por medio de la aplicación de un cuestionario.

8.4. Evaluación de las cepas de *Pleurotus spp.* aisladas de maguey con los productores rurales de hongos comestibles

La evaluación se realizaría por 2 medios:

- 1. Encuesta directa a los productores:** Se considera en el cuestionario que se aplicará a los productores, las variables necesarias para evaluar la aceptación en el mercado, tales como:
 - El tiempo para obtener las fructificaciones
 - Calidad de las cepas
 - Rendimiento de las cepas
 - Aceptación en cuanto a sabor y textura.

- 2. Evaluación directa de las unidades por el evaluador:** En este punto, se considerará la aparición de primeros primordios, tamaño promedio de los hongos, número de fructificaciones.

8.5. Comercialización

La introducción de nuevas cepas de hongos comestibles con diversas características organolépticas puede abrir nuevos nichos de mercado e incluso puede impulsar la generación de nuevas empresas capaces de ofrecer un producto de excelente calidad, tanto a nivel nacional como internacional.

8.6. Comentarios finales

El aprovechamiento de los recursos micológicos con los que cuenta el territorio nacional es de gran importancia, ya que por una parte se conserva el conocimiento etnomicológico, y por otra, se extiende la posibilidad de emplear estos recursos a otras áreas de la biotecnología, como lo es la medicina, biorremediación y tecnología de alimentos. Y además, es una forma de preservar estos recursos naturales antes que el cambio climático termine con ellos. Asimismo, la actividad productiva generada por las estas cepas traerá beneficios sociales, económicos y ecológicos al país.

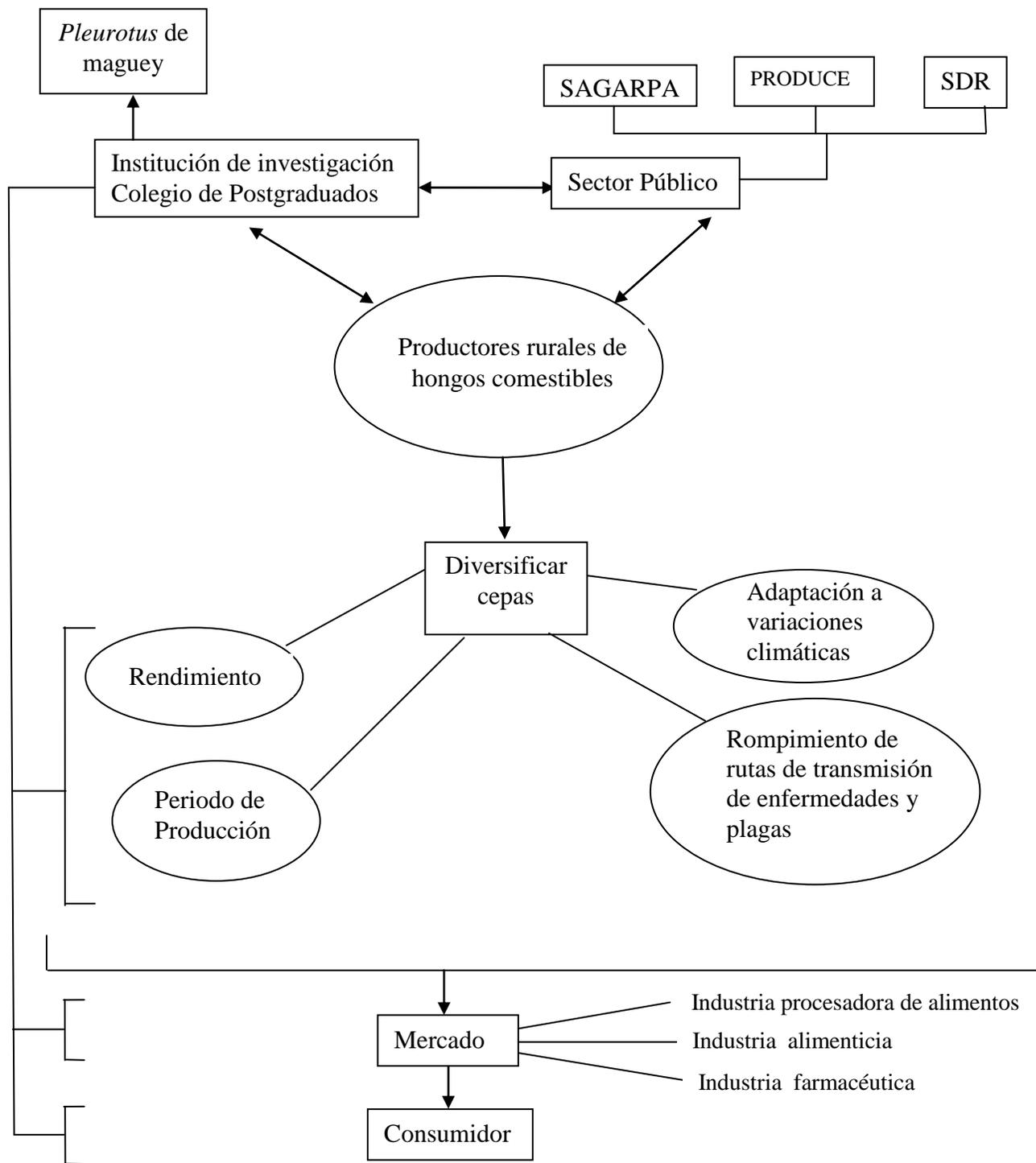


Figura 8.1. Estrategia propuesta para el aprovechamiento y uso de los recursos micológicos de las cepas de *Pleurotus* aisladas de maguey

IX. EVALUACIÓN DE HIPÓTESIS

9.1. Evaluación de la primera hipótesis:

- Es posible producir en condiciones de laboratorio los recursos genéticos nativos de los “Hongos del Maguey” de la región central de México, los cuales pueden ofrecer mayor o igual adaptabilidad a las condiciones locales que las cepas extranjeras cultivadas actualmente.

9.1.1. Evidencia que sostiene a la hipótesis

De los parámetros evaluados, las cepas entre las cuales no presentan diferencia estadística en 6 de 7 parámetros son la CP-366, CP-424 y CP-460 (**Tabla 9.1**), lo cual sostiene que presentan igual adaptabilidad a las condiciones locales de cultivo, en comparación con la cepa comercial. En cuanto a las propiedades organolépticas, de acuerdo al estudio exploratorio, los “Hongos del Maguey” presentan mayor aceptación en cuanto a sabor y preferencia de compra que las cepas comerciales consideradas como referencia. Lo cual, eleva las probabilidades de que este recurso y su tecnología de cultivo pueda transferirse con éxito a los productores rurales de hongos comestibles.

Tabla 9.1. Comparación de las cepas estudiadas de *Pleurotus* con aquellas de referencia, en lo que respecta a los parámetros evaluados de producción y propiedades.

		Competitividad						Propiedades organolépticas			Criterios cubiertos
		Producción									
	Cepa	CS	APP	TUC	EB	TP	CC/P	S	C	C/PO	
		(días)	(días)	(días)	(%)						
1	CP-50	14.0	27.8	66.5	56.43	0.7102	Si	1	1	Si	7
2	CP-253	13.8	15.5	52.5	47.90	0.8796	Si	2	4	No	6
3	CP-468		18.0	35.8		0.6665	Si	2	1	Si	5
4	CP-362		50.0	79.9			No	2	2	Si	4
5	CP-363				51.43	0.3796	No	4	3	Si	4
6	CP-366	10.0	11.0	34.0		0.8906	Si	4	2	Si	6
7	CP-375		27.3	91.0			No	3	1	Si	4
8	CP-424	10.0	20.5	45.3		0.6583	Si	2	3	Si	6
9	CP-426		41.6				No	2	1	Si	3
10	CP-460	14.3	33.3	65.5	47.37	0.6817	Si	2	5	No	6
11	CP-517	13.0			44.86		No	2	3	Si	4

CS= Colonización del sustrato. APP= Aparición de primeros primordios. TUC= Período para la última cosecha. EB= Eficiencia biológica. TP= Tasa de producción. CC/P= Cepa competitiva por producción. S= Sabor (escala: 0= Insípido, 1= Poco intenso, 2= Agradable, 3= Sabroso, 4= Delicioso). C= Consistencia (escala: 0= Muy suave, 1= Suave, 2= Firme suave, 3= Similar a “carne”, 4= Ligeramente coriácea, 5= Coriácea, 6= Muy coriácea). C/PO= Competitiva por propiedades organolépticas.

9.1.2. Interpretación

Al analizar la primera hipótesis se considera que si se sostiene, ya que los recursos nativos de los hongos comestibles aunque no presentan esa riqueza genética dirigida y específica como la de una cepa híbrida comercial, si poseen toda una selección natural que los respalda, y que incluso los hace mejor adaptados que la cepa comercial, con muchas otras características que a lo largo de varios años se han ido seleccionando, y con seguridad la cepa comercial no las posee.

9.2. Evaluación de la segunda hipótesis:

- Las cepas nativas de *Pleurotus* aisladas de plantas de *Agave* presentan más resistencia genética natural al ataque del “moho verde” *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* que la cepa comercial.

9.2.1. Evidencia que sostiene a la hipótesis

La hipótesis se sostiene por los resultados obtenidos que demuestran que los “Hongos de Maguey” son capaces de limitar el desarrollo del competidor *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. De acuerdo con la **Tabla 9.2 ; 9.3** y **Figura 9.1** se pudo apreciar que por lo menos en dos de las tres cepas que se confrontaron contra *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* presentan mayor resistencia que la cepa comercial, por lo cual, existe la posibilidad de encontrar características importantes en estos recursos, las cuales puedan emplearse de forma constante no sólo en la producción de hongos comestibles, sino también en otras áreas de la actividad humana. Por una parte, las cepas probadas limitaron la extensión del competidor, y por otra, el porcentaje de esporulación se observó evidentemente reducido.

Tabla 9.2. Distancia limitante de confrontación (DLC) en los co-cultivos entre las cepas seleccionadas de *Pleurotus* vs. *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-112) en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto día de la inoculación.

Especie	Cepas	± EE DLC (mm)
<i>P. ostreatus</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-50 vs. CPM-112	9.6 ± 0.6 a
<i>P. sp.</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-517 vs. CPM-112	12.5 ± 0.3 bc
<i>P. sp.</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-460 vs. CPM-112	14.2 ± 0.6 c
<i>P. sp.</i> vs. <i>Trichoderma</i>	CP-363 vs. CPM-112	10.7 ± 0.3 ab

*= Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las medias, de acuerdo a la Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Tabla 9.3. Análisis comparativo de la esporulación (número de conidiosporas \pm error estándar) de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-112) en tres zonas de muestreo de los co-cultivos con las cepas seleccionadas de *Pleurotus* en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto día de la inoculación.

Especie	Cepa	Zona 1	Zona 2	Zona 3
<i>P. ostreatus vs. Trichoderma</i>	CP-50 vs. CPM-112	2,925,000 \pm 153885.0 c	300,000 \pm 33333.3 a	0
<i>P. sp. vs. Trichoderma</i>	CP-517 vs. CPM-112	1,825,000 \pm 123884.0 b	125,000 \pm 41666.7 a	0
<i>P. sp. vs. Trichoderma</i>	CP-460 vs. CPM-112	400,000 \pm 66666.0 a	100,000 \pm 40824.8 a	0
<i>P. sp. vs. Trichoderma</i>	CP-363 vs. CPM-112	2,125,000 \pm 93169.5 b	350,000 \pm 76376.3 a	0
<i>T. aggressivum f. aggressivum</i>	CPM-112	4,025,000 \pm 228066.0 d	4,025,000 \pm 245657.0 a	0

*= Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las medias, de acuerdo a la Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

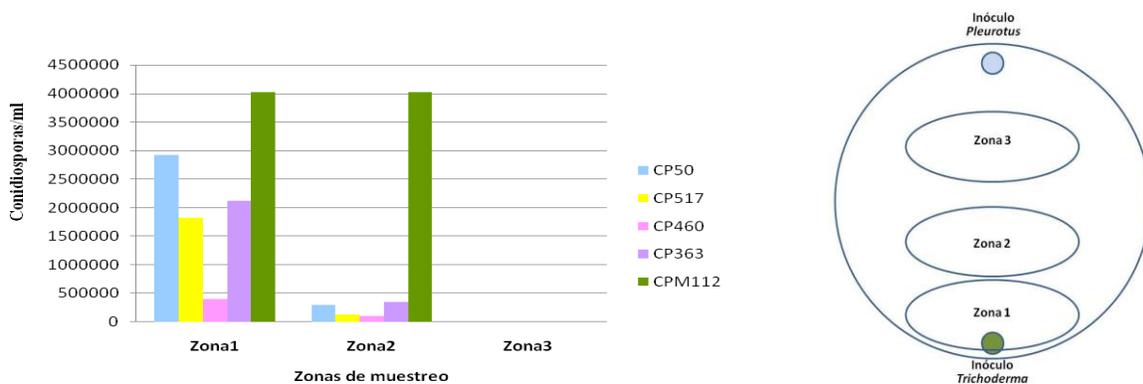


Figura 9.1. Esporulación de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-112) en tres zonas de muestreo de los co-cultivos con las cepas seleccionadas de *Pleurotus* en agar con dextrosa y papa (PDA, pH= 5.6), al cuarto día de la inoculación.

9.2.2. Interpretación

Esta segunda hipótesis se sostiene, debido a que específicamente los “Hongos de Maguay” se desarrollan en condiciones muy difíciles, por lo que se considera que han desarrollado sistemas de tolerancia a condiciones extremas. Dicha característica hace a estos recursos que posean un gran potencial para ser producidos, y que puedan ser la solución a los principales problemas que presentan los productores de hongos comestibles.

LITERATURA CITADA

- Ancona, L., G. Cetz, R. Beldar, & C. Sandoval. 2007. Cultivo de *Pleurotus djamor* y *P. ostreatus* en Yucatán. En “*El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*”. ECOSUR.
- Anzaldúa, A. 2005. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial Acribia. España.
- Ardon, O., Z. Kerem, & Y. Hadar. 1998. Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Canadian Journal of Microbiology*. 44, 7: 676.
- Baldrian, P. 2004. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 50: 245-253.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30: 215-242.
- Barron, G. L. and R. G. Thorn. 1987. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canad. J. Bot.* 65: 774-778.
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Can J. Bot.* 62: 924-931.
- Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69: 2357-2372.
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Can. Journal. Bot.* 70: 639-641.
- Boa, E. 2004. Los hongos silvestres comestibles; Perspectiva global de su uso e importancia para la población. Rome: FAO
- Bodley J.H. 2005. Cultural Anthropology: Tribes, States and the global system. New York: McGraw-Hill.
- Bourbonnais R., M.G. Paice, I.D. Reid, P. Lanthier & M. Yaguchi. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Env Microbiol* 61:1876-1880.
- Bresinsky, A.,M. Fischer, B. Meixner, W. Paulus. 1987. Speciation in *Pleurotus*. *Mycologia*, 79(2): 234-245.
- Brown, W.L. 1983. Genetic Diversity and genetic vulnerability –An appraisal. *Economic botany*. 37 (1): 4-12.

- Calvo-Bado, L. 2002. Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas. En: *La Biología y el Cultivo de Pleurotus* spp. J. E. Sánchez, D. Royse, ECOSUR/Limusa, Méx.
- Casasanero-Orduña, R. 2008. Producción de lacasas en cultivos líquidos de *Pleurotus ostreatus* infectados con *Trichoderma* spp. Tesis profesional para obtener el título de químico industrial. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Autónoma de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Castañeda, V.T., & H. Leal. 2007. Factores que influyen en la producción de substratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. En: *El cultivo de setas Pleurotus* spp. en México. ECOSUR.
- Castle, A., D. Speranzini, N. Rghei, G. Alm, D. Rinker & J. Bissett. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1): 133-137.
- Collins, P.J. & A.D.W. Dobson 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3444–3450.
- Cuevas, J.A. 1988. Recursos filogenéticos: Bases conceptuales para su estudio y conservación. Chapingo. Méx.
- Cha, J. S. 2005. Manejo de plagas y enfermedades. *Manual del cultivador de hongos I. Parte II Hongos ostra*. MushWorld
- Challen, M. P., A. J. Moore y D. Martínez-Carrera. 1995. Facile extraction and purification of filamentous fungal DNA. *BioTechniques* 18: 7-8.
- Chang, H.-M., C.-L. Chen and K.T: Kirk. 1980. The Chemistry of lignin degradation by white-rot fungi. In “Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications”.
- Chang, S.T. & P.G. Miles 1989. Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press. Boca Ratón Florida. U.S.A.
- Chang, S.T. & P.G. Miles 2004. Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. CRC Press. Florida. U.S.A.
- Chang, S.T., J.A. Buswell & P.G. Miles. 1999. Genetics and breeding of edible mushrooms. Gordon and Breach Science Publishers.
- Chen, X., C. P. Romaine, M. D. Ospina-Giraldo & D. J. Royse. 1999. A polymerase chain reaction-based test for the identification of *Trichoderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mold epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 246-250.

- Chiu S.W., S. C. Law, M.L. Ching, K.W. Cheung, & M. J. Chen. 2000. Themes for mushroom exploitation in the 21st century: Sustainability, waste management, and conservation. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 46: 269–282. China.
- Cho, N.S; E. Malarczyk; G. Nowak; M. Nowak; J. Kochmanska-Rdest; A. Leonowicz and S. Ohga. 2002. Changes in phenol oxidases and superoxide dismutase during fruit-body formation of *Pleurotus* on sawdust culture. *Mycoscience* 43: 267-270.
- Das, N., S. Sengupta, and M. Mukherjee. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 4120-4122.
- Eck, R.V. & Dayhoff M.O. 1966. Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K., 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151–1158.
- Eichlerova, I., K. Ruel, L. Homolka, J. P. Joseleau, & F. Nerud. 2000. Ligninolytic characteristics of *Pleurotus ostreatus* strain F6 and its monokaryotic protoplast derivative P19. *Canadian Journal of Microbiology*; Dec; 46, 12; p. 1153-1158.
- Elisashvili, V., M. Penninckx, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, E. Metreveli, T. Kharziani, & G. Kvesitadze. 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology* 99: 457–462
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Ferri, F. 1985. I funghi. Edagricole, Bologna.
- Fletcher, J. T. 1987. Weed moulds. *The Mushroom Journal* 174: 198-200.
- Fletcher, J.T., P.F. White, R.H. Gaze. 1986. Champiñones. Control de las enfermedades y plagas. Ed. ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España.
- Fletcher, J.T.; P.F. White & R.H. Gaze. 1997. Mushrooms: Pest and disease control. Intercept, England.
- Flores, C., C. Vidal, M.R. Trejo-Hernández, E. Galindo, L. Serrano-Carreón. 2009. Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. *J. Appl. Microbiol.*, 106, 249-257.

- Flores, C., R. Casasanero, M.R. Trejo-Hernández, E. Galindo, L. Serrano-Carreón. 2010. Production of laccases by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation in co-culture with *Trichoderma viride*. *J. Appl. Microbiol.*, 108, 810-817.
- Fox, F. M. 1992. Aspects of tropical mycology, Cambridge University Press.
- Furst, P.E., S.H. Snyder, B.L. Jacobs & J.H. Jaffe 1995. Enciclopedia de las Drogas Psicoactivas/Hongos/Especies alucinógenas. Ed. Diana. Méx.
- Gaitán-Hernández, R. & D. Salmenes. 1996. Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus* spp. con alto rendimiento. *Revista Mexicana de Micología*. 12: 107-113.
- Gea, F.J. 2002. Plagas y enfermedades del género *Pleurotus*. En: *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* pp. 205-224. Sánchez, J.E. y D. Royse. Ed. LIMUSA.
- González-Morán, G. 1996. Técnicas en biología celular. Teoría y práctica. AGT Editor, S. A.
- Guzmán, G. 1994. Los hongos y líquenes en la medicina tradicional. In *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III*. Edited by: Argueta V, Cano A, Rodarte M. Mexico, D.F.: INI;:1427-1487.
- Hernández-Ibarra, H., J.E. Sánchez-Vázquez & L. Calvo-Bado. 1995. Estudio de cinco cepas nativas de *Pleurotus* spp. de la región de Tapachula Chiapas México. *Revista Mexicana de Micología*. 11: 29-38. México.
- Herrera, T. & M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. Ed. Fondo de Cultura Económica. México.
- Herrera-Estrella, A. & C. Carsolio. 1998. Medio ambiente, control biológico y hongos parásitos. CINVESTAV. *Avance y Perspectiva* 17: 195-204.
- Hibbett, D. S. & R. G. Thorn. 1994. Nematode-Trapping in *Pleurotus tuberregium*. *Mycologia* 86 (5): 696-699.
- Huerta, G., D. Martínez-Carrera, J. E. Sánchez, H. Leal-Lara & R. Vilgalys. 2010. Genetic relationships between mexican species of *Pleurotus* analyzing the ITS-region from RDNA. *Micología Aplicada Internacional*. 22 (1): 15-25.
- Hunn, E. 1982. The utilitarian factor in folk biological classification. *American Anthropologist*. 84:830-847.
- Hussey N.W. & B. Gurney, 1968. Biology and control of the sciarid *Lycoriella auripila* Winn (Díptera: Lycoriidae) in mushroom culture. *Ann. Appl. Biol.* 62: 395-403.
- Intiaj, A & L. Tae-Soo. 2007. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural Sciences* 3 (3): 316-321. Korea.

- Johal, K. and R.H.L. Disney, 1994. Phoridae (Diptera) as pests of cultivated oyster mushrooms (Agaricales: Pleurotaceae) in India. *Bull. Entomol. Res.* 84: 247-254.
- Kalmıs, E., N. Azbar, H. Yıldız, & F. Kalyoncu. 2008. Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. *Bioresource Technology* 99: 164–169
- Kaul, T.N. 2002. Biology and conservation of mushrooms. Science Publishers, Inc.
- Komón-Zelazowska, M., J. Bissett, D. Zafari, L. Hatvani, L. Manczinger, S. Woo, M. Lorito, L. Kredics, C. P. Kubicek, & I. S. Druzhinina. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov., p. 7415–7426.
- Kong, W. S. 2004. Spawn, Mushroom Growers' Handbook. Part II. Oyster Mushrooms. pp. 55-61.
- Krishnamoorthy A.S., T. Marimuthu, K. Sivaprakasam & R. Jeyarajan. 1991. Occurrence and damage caused by phorid fly on oyster mushroom. *Mush. J. Tropics* 11: 23-27.
- Kuforiji, O.O., & I.O. Fasidi. 2007. Enzyme activities of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer, cultivated on selected agricultural wastes. *Bioresour. Technol.*, doi:10.1016/j.biortech.2007.08.053.
- Kullnig, C., G. Szakacs, & C.P. Kubicek. 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol. Res.* 104 (9): 1117-1125.
- Labarère, J. & F. Bois. 2002. La conservación y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. En: *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* pp. 85-123. Sánchez, J.E. y D. Royse. Ed. LIMUSA.
- Lakhanpal, T. N. & M. Rana. 2005. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3:288-303 Cambridge University Press. India.
- Le Roith, D., J. Shiloach, & J. Roth. 1982. Is there an earlier phylogenetic precursor that is common to both the nervous and endocrine systems? *Peptides*. 3 (3): 211-215.
- Lobo, M. & C. I. Medina. 2009. Conservación de recursos genéticos de la agrobiodiversidad como apoyo al desarrollo de sistemas de producción sostenibles *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 10 (1): 33-42.
- Locci, E., S. Laconi, R. Pompei, P. Scano, A. Lai, & F. C. Marincola. 2007. Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: A solid-state Carbon-13 NMR study. *Bioresour. Technol.*, doi:10.1016/j.biortech.2007.08.048.

- Lull, C., H. J. Wichers, & H. F. J. Savelkoul. 2005. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*. 2: 63–80.
- Lyr, H. 1987. Outlook. In: Horst Lyr (Ed.). *Modern selective fungicides. Properties, applications and mechanisms of action*. Longman Scientific & Tech. New York. USA. 367-371.
- Margulis, L. & K.V. Schwartz 1982. Cinco reinos. W.H. Freeman & Company, San Francisco, U.S.A.
- Martínez-Carrera, D. 1995. Classical and molecular characterization of the *Agaricus bitorquis* complex. Ph. D. thesis. King's College London.
- Martínez-Carrera, D. 1998. Oyster mushrooms; Pp. 242-245. In: *McGraw-Hill. Yearbook of Science & Technology*. Ed. McGraw-Hill, Inc., New York. U.S.A.
- Martínez-Carrera, D. 2000. Mushroom biotechnology in tropical America. *The International Journal of Mushroom Sciences*, 3(1), pp. 9-20.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, & M. Quirarte. 1986. Obtención y caracterización de híbridos de cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*. *Rev. Mex. Mic.* 2: 227-238.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal & A. Larqué-Saavedra. 1992. ¿Reconversión en la industria de hongos?. *Tecnoindustria* (CONACYT) 7: 52-59.
- Martínez-Carrera, D., A. Larqué-Saavedra, P. Morales, M. Sobal, W. Martínez & A. Aguilar. 1993 . Los hongos comestibles en México: biotecnología de su reproducción. *Ciencia y Desarrollo* (CONACYT) 108: 41-49.
- Martínez-Carrera, D., N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. 2010. Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Martínez-Carretero, E. 1992. Recursos naturales, biodiversidad, conservación y uso sustentable. *Multequina* 1: 11-18
- Matsumoto, T., K. Mimura, & Y. Fukumasa-Nakai. 1995. Isozyme variation and genetic relatedness among natural populations of *Pleurotus ostreatus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41: 487-497. Japan
- Miles, P.G. & S.T. Chang. 1997. Mushroom biology. World Scientific Publishing Co. Singapore.
- Milner-Gulland, E. J. & R. Mace. 1998. Part 1 Introduction to the conservation of biological resources. p.p. 1-3. In: Conservation of biological resources. Willey-Blackwell. U.K.

- Mohan S., S. Mohan & R.H.L. Disney. 1995. A new species of scuttle fly (Diptera: Phoridae) that is a pest of oyster mushrooms (Agaricales: Pleurotaceae) in India. *Bull. Entomol. Res.* 85: 515-518.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, & D. Martínez-Carrera. 2007. El centro de vinculación con el sistema de producción-consumo de los hongos comestibles (CVINHCO) del Colegio de Postgraduados. pp. 149-159. En: *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. ECOSUR.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, P. Ramírez-Carrasco, I. Tello, T. Spezzia, N. Lira, R. De Lima, S. Villa, E. Montiel, & D. Martínez-Carrera. 2010. Los hongos comestibles y medicinales en México: recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo. pp. 91-108. En: *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora.
- Morales, P., M. Sobal, W. Martínez, A. Larqué-Saavedra & D. Martínez-Carrera. 1995. La cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, híbrido comercial seleccionado por mejoramiento genético en México. *Micología Neotropical Aplicada* 8: 77-81.
- Mumpuni, A., H. S. S. Sharma, & A. E. Brown. 1998. Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* Biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. *Applied and environmental microbiology*. 64 (12): 5053-5056.
- Murrieta, D. M., G. Mata y L. Iglesias. 2002. Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. Cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. *Foresta Veracruzana* 4(1): 47-52. Xalapa, Méx.
- Murrieta, D. M., L. Iglesias, & G. Mata. 2005. Caracterización bioquímica de seis cepas de *Pleurotus*. *Revista Mexicana de Micología*. pp. 71-76.
- Muthumeenakshi, S., P. R. Mills, A. E. Brown & D. A. Seaby. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiol.* 140: 769-777.
- Nei, M. 1976. Mathematical models of speciation and genetic distance. In: Karlin S. and Nevo E. (ed), *Population Genetics and Ecology*. Academic Press, New York, USA. pp. 723-766.
- Nei, M. & Kumar. S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Oei, P. 1996. *Mushroom cultivation*. Tool Publications, The Netherlands.

- Ortega-Garrido, P. 2002. Plagas, enfermedades y competidores en plantas productoras de hongos comestibles en la región central de México y la estrategia para su prevención y control. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados *campus* Puebla.
- Palmieri, G., P. Giardina, C. Bianco, A. Scaloni, A. Capasso & G. Sannia. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (50): 31301-31307.
- Park, M. S., G. S. Seo, K. H. Lee, K. S. Bae & S. H. Yu. 2005. Morphological and cultural characteristics of *Trichoderma* spp. associated with green mold of oyster mushroom in Korea. *Plant Pathol. J.* 21(3) : 221-228.
- Portilla E. & A. Zavala. 1990. Oikos Un diccionario de ecología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Purvis, A. & A. Hector. 2000. Getting the measure of biodiversity. *Nature*. Vol. 405, pp. 212-219.
- Raper, C.A. 1978. Sexuality and Breeding. *En: The biology and cultivation of edible mushrooms*. S.T. Chang, W.A. Hayes. Academic Press, New York, U.S.A.
- Rinker, D.L., D. Betterley 1994. *Trichoderma* green mold. *Mushroom News*. p. 28-31.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological papers*, No. 1, pp 1-56.
- Riva, S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*. 24 (5): 219-226.
- Royse, D.J. 2003. Cultivation of oyster mushrooms. p. 9. The Pennsylvania State University.
- Royse, D.J. & J.E. Sánchez. 2002. La importancia del cultivo de *Pleurotus* spp. Estadísticas mundiales de producción, con énfasis en Hispanoamérica. *En: La Biología y el Cultivo de Pleurotus* spp. JE. Sánchez D. Royse. ECOSUR/ Limusa, México.
- Rühl, M, S. Kilaru, A. Majcherczyk, P.J. Hoegger, M. Navarro-Gonzalez, W. Chaisaena, A. Naumann, S. Peddireddi, I. Malik, & U. Kües. 2007. Biotechnological research on basidiomycete fungi. *A review of forests, wood products and wood biotechnology of Iran and Germany*. pp. 58-69. Germany.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salmones, D. y G. Mata. 2007. Determinación de la variabilidad de respuesta de micelios de *Pleurotus* vs. *Trichoderma* en medios de cultivo derivados solubles de lignina y pulpa de café. *Revista Mexicana de Micología*, Diciembre, 25: 77-81. Xalapa, México.

- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Samuels, G.J., S.L. Dodd, W. Gams, L.A. Castlebury, & O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94 (1) p.146-170.
- Sánchez, J.E., D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal-Lara. 2007. El cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México. ECOSUR.
- Savoie, J. M. & G. Mata. 2003. *Trichoderma harzianum* metabolites pre-adapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. *Mycologia*, 95(2), pp. 191–199
- Seaby, D.A. 1989. Further observations on *Trichoderma*. *The Mushroom Journal*. 197: 147-151.
- Seaby, D. A. 1996. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Pl. Pathol.* 45: 905-912.
- Sharma, H. S., M. Kilpatrick, F. Ward, G. Lyons & L. Burns. 1999. Colonization on phase II compost by biotypes of *Trichoderma harzianum* and their effect on mushroom yield and quality. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 572-578.
- Singer, R. 1975. The Agaricales in Modern Taxonomy. 3rd ed. Cramer, Vaduz.
- Snetsinger, R. 1972. Laboratory studies of mushroom-infesting arthropods. *Mushroom Science* 8: 199-208.
- Sobal, M., P. Morales & D. Martínez-Carrera. 1989. Efecto del pH sobre el crecimiento de diversas cepas mexicanas y extranjeras de hongos comestibles en el laboratorio. *Micol. Neotrop. Apl.* 2: 19-39.
- Sobal, M., D. Martínez-Carrera, P. Morales, & S. Roussos. 2007 a. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micologia Aplicada Internacional*. 19 (1): 15-23.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, G. Huerta, & D. Martínez Carrera. 2007 b. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. pp. 27-40. En: *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. ECOSUR.
- Stajić, M., L. Persky, D. Friesem, Y. Hadar, S. P. Wasser, E. Nevo, & J. Vukojević. 2007. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38 : 65–73.
- Stoller, B.B. 1962. Some practical aspects of making mushroom spawn. *Mushroom Science* 5: 170-184.

- Tamura, K., M. Nei & S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA). *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thorn, R. G., & A. Tsuneda. 1993. Interactions between *Pleurotus* species, nematodes, and bacteria on agar and in wood. *Trans. iI,IycoE. Soc. Japan* 34: 449-464.
- Tinoco, R., M.A. Pickard & R. Vazquez-Duhalt. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 32: 331-335.
- Tschierpe H.J. & K. Hartmann. 1977. A comparison of different growing methods. *Mushroom Journal* 60: 404-416.
- Turner, N.J. 1988. The importance of a rose: Evaluating the cultural significance of plants in Thompson and Lillooet Interior Salish. *American Anthropologist*, 90:272-290.
- Urbanelli, S., V. Della Rosa, C. Fanelli, AA Fabbri & M. Reverberi. 2003. Genetic diversity and population structure of the Italian fungi belonging to the taxa *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quéf and *P. ferulae* (DC.:Fr.) Quéf. *Heredity* 90: 253–259.
- Valášková, V. & P. Baldrian. 2006. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology* 157: 119–124
- Vedie, R. 1993. Les cécidomytes et la cultura du champignon de Paris. *Bull. F.N.S.A.C.C.* 57: 24-33
- Velázquez-Cedeño, M.A., A.M. Farnet, F. Ferré & J.M. Savoie. 2004. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. *Mycologia*, 96(4): 712-719.
- Vidal, C. 2007. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. Inductoras de la producción de lacasas en cultivos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* en medio sólido. Tesis Profesional. Univesidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Vilgalys, R., J. M. Moncalvo, S. R. Liou & M. Volovsek. 1996. Recent advances in molecular systematics of the Genus *Pleurotus*. Pp. 91-101. *In: Mushroom Biology and Mushroom Products*. Ed. D. J. Royse. Pennsylvania State University, University Park.
- Villarreal, L., & J. Pérez-Moreno. 1989. Los hongos comestibles de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada*. 2: 77-114.

- Vogel, F. & D. Salmones. 2000. Análisis comparativo de la productividad de cepas de *Pleurotus* spp. cultivadas en una planta comercial. *Rev Iberoam Micol.* 17: 138-141
- Wainwright, M. 1995. Introducción a la biotecnología de los hongos. Ed. ACRIBIA S.A. Zaragoza, España.
- Wetzel, H. A., P.J. Wuest, D.J. Rinker & R.J. Findley. 1982. Significant insect pests of commercial mushroom. In: P.J. West and G.D. Bengtson (eds), *Penn State handbook for commercial mushroom growers*. The Pennsylvania State University.
- White, L. 1992. La energía y la evolución de la cultura. En: Bohannon, P & Glazer, M. *Antropología. Lecturas*. McGraw-Hill. Madrid.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Academic Press, San Diego.
- Ying, J.Z.; X.L. Mao; Q.M. Ma; Y.C. Zong & H.A. Wen. 1987. *Icones of medicinal fungi from China*. Edited by: X. Yuehan. Beijing: Science Press.
- Zervakis, G., & C. Balis. 1992. Comparative study on the cultural characters of *Pleurotus* species under the influence of different substrates and fruiting temperatures. *Micol. Neotrop. Apl.* 5: 39-47.
- Zimmermann, W.E. 1951. Recursos de industrias del mundo. FCE p. 13. Méx.

ANEXOS

Anexo A:

Caracterización macroscópica de las fructificaciones de las cepas estudiadas

Tabla 1a. Características de las fructificaciones de las cepas de *Pleurotus* spp aisladas de maguay consideradas en el presente estudio.

CEPAS	Pileo						Estípite			FC Peso (g)	
	Forma	Borde	Color	Láminas / cm	Consistencia	Textura	Dimensión (Al xAn) cm	Color	Textura		Dimensión(LxA) cm
CP-98	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CP-194	Caliciforme irregular	Ondulado	Crema	17	Quebradizo	Escamoso	18.9x12	Blanco amarillento	Liso	4.5x3.0	172.0
CP-358	De ostra	Entero a ligeramente ondulado	Crema amarillento	13	Firme, pero quebradizo	Liso	10.5x12.6	Amarillo claro	Ligeramente estriado, tomentoso en la base	11.7x1.3	86.8
CP-359	Caliciforme	Ondulado	Blanco hueso	18	Suave	Liso	13x12	Blanco hueso	Aterciopelado	10.2x1.5	70.0
CP-360	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CP-361	Trilobulado	Lobulado	Blanco	17	Muy quebradizo	Liso	5.2x8.3	Blanco amarillento	Liso a rugoso	3x0.9	10.0
CP-362	Aconchada, ligeramente infundibular	Entero a ligeramente ondulado	Amarillo	14	Firme, pero muy frágil	Liso	7x8.6	Blanco amarillento	Ligeramente estriado	5.3x0.65	29.0
CP-363	Caliciforme irregular	Ondulado	Blanco- crema	18	Suave, firme	Aterciopelado	15.5x27.5	Crema	Aterciopelado	9.5x1.4	135.0
CP-364	Infundibular	Ligeramente ondulado	Blanco	19	Suave	Liso	7x13.5	Blanco	Liso	7.5x0.8	23.5
CP-365	Arriñonada a triangular	Ondas grandes inclinadas	Amarillento	15	Firme, pero quebradizo	Liso	11.7x9	Blanco amarillento	Liso	6.7x1.8	71.5

AlxA= Dimensión del pileo considerando alto por ancho; LxA= Dimensión del estípite considerando largo por ancho; FC= Fructificación completa

Tabla Ib. Características de las fructificaciones de las cepas de *Pleurotus* spp aisladas de maguay consideradas en el presente estudio.

CEPAS	Píleo						Estípite			FC Peso (g)	
	Forma	Borde	Color	Láminas / cm	Consistencia	Textura	Dimensión(Al xAn) cm	Color	Textura		Dimensión (LxA) cm
CP-366	Petaliforme	Ligeramente ondulado	Crema a café claro al centro	9	Suave quebradizo	Liso a escamoso	7x7.5	Amarillento	Ligeramente estriado, coriáceo	1.5x0.9	15.7
CP-373	Lobulado	Ondulado	Blanco crema	24	Suave	Aterciopelado	9x15.5	Blanco	Liso	4.5x1.1	62.5
CP-375	Petaliforme, infundibular	Entero a ligeramente ondulado	Blanco- crema	21	Suave	Liso, rugoso al centro	16.5x13.5	Blanco amarillento	Liso	8.5x1.3	81.0
CP-376	Vermiforme	---	Blanco crema	---	Suave	Liso	1.4x0.7	Amarillento	Liso	4.4x0.3	0.2
CP-424	Petaliforme cóncavo a ostra multilobulada	Ondas grandes inclinadas	Crema	18	Suave, quebradiza	Liso a ligeramente estriado	9x9	Crema	Estriada	1x1	27.7
CP-425	De ostra multilobulada	Lóbulos que se enrollan y separan	Blanco crema, a amarillento	19	Suave, flexible	Aterciopelado	9x16	Crema	Liso	4.5x0.7	49.0
CP-426	De ostra a ameboidea multilobulada	Lóbulos que se enrollan y separan	Blanco- Crema	16	Suave, muy quebradiza	Liso	5x6.8	Blanco amarillento	Liso, ligeramente estriado	0.5x0.5	5.3
CP-460	Petaliforme, infundibular	Ondulado	Amarillo a Amarillo claro	17	Quebradizo, frágil	Escamoso discreto a ligeramente escamas conspicuas	7.5x7.5	Amarillo claro con blanco	Ligeramente estriado	5x0.9	21.0
CP-515	Ostra irregular	Ligeramente ondulado	Blanco crema	14	Suave	Liso	9.0x18.0	Amarillo	Estriado	7.5x1.5	55.0
CP-516	Ostra irregular multilobulada	Lóbulos grandes, separados, inclinados	Crema amarillento	11	Suave	Liso	13.5x18.8	Crema	Liso	5.3x2.5	95.0

AlxAn= Dimensión del píleo considerando alto por ancho; LxA= Dimensión del estípite considerando largo por ancho; FC= Fructificación completa

Tabla I. Características de las fructificaciones de las cepas de *Pleurotus* spp aisladas de maguay consideradas en el presente estudio.

CEPAS	Píleo					Estípite			FC Peso (g)		
	Forma	Borde	Color	Láminas /cm	Consistencia	Textura	Dimensión (Al xAn) cm	Color		Textura	Dimensión(LxA) cm
CP-517	Ostra ovalada	Entero a ligeramente ondulado	Amarillo crema	27	Quebradizo, frágil	Ligeramente escamoso	8x7	Amarillo crema	Liso, ligeramente estriado	5x0.9	20.4
CP-518	Aconchada, ligeramente infundibular	Ligeramente ondulado a ondas grandes	Amarillo crema	18	Firme, quebradizo	Ligeramente escamoso	12x17	Blanco amarillento	Liso	7.9x1.1	78.0
CP-524	De ostra multilobulada	Muy ondulado	Blanco con zonas escamosas café	16	Suave, quebradizo	Ligeramente escamoso a muy escamoso	10x14.3	Amarillento	Liso a rugoso irregular	3.5x0.6	30.0
CP-525	Cóncavo irregular	Ligeramente ondulado a ondas grandes	Blanco	12	Suave	Lisa	27x19	---	---	---	148.0

AlxAn= Dimensión del píleo considerando alto por ancho; LxA= Dimensión del estípite considerando largo por ancho; FC= Fructificación completa

Tabla II. Características de las fructificaciones de las cepas de *Pleurotus* spp. de referencia consideradas en el presente estudio.

CEPAS	Píleo					Estípite			FC Peso (g)		
	Forma	Borde	Color	Láminas / cm	Consistencia	Textura	Dimensión (Al xAn) cm	Color		Textura	Dimensión (LxA) cm
CP-50	Ovalada elipsoide	Entero a ligeramente ondulado	Amarillo claro	15	Firme flexible	Liso	7.5x10.6	Blanco amarillento	Estriado	4x0.5	22.8
CP-253	Petaliforme, de ostra	Entero a ligeramente ondulado	Blanco grisáceo a crema	17	Blando flexible	Liso a ligeramente estriado	10x9.8	Blanco crema	Liso	1.1x0.8	20.3
CP-468	Petaliforme	Entero a ondulado	Grisáceo	12	Suave	Liso, ligeramente estriado	11.5x16	Blanco amarillento	Liso, fibroso	2x1.4	34.5

AlxAn= Dimensión del píleo considerando alto por ancho; LxA= Dimensión del estípite considerando largo por ancho; FC= Fructificación completa.

Anexo B:

Preparación de reactivos:

I. Buffer de acetatos

Para la recuperación de las enzimas en los co-cultivos, se empleó buffer de acetatos pH 5 0.1 mM, que está constituido por:

- **Solución de acetato de sodio (0.1M):**
3.4025 g de acetato de sodio disuelto en 250 ml de agua destilada.
- **Solución de ácido acético (0.1 mM):**
0.572 ml de ácido acético diluido en 100 ml de agua destilada.

La solución de ácido acético se vierte sobre la solución de acetato de sodio hasta ajustar pH a 5, aproximadamente se requieren 90 ml de la solución de ácido acético para los 250 ml de la solución de acetato de sodio.

II. Substratos utilizados para determinar actividad lacasa

Los substratos utilizados para determinar actividad enzimática de lacasa corresponden a los más citados en la bibliografía y se muestran en la siguiente tabla:

Tabla A. Características de los substratos empleados para realizar actividad enzimática de lacasa

Substrato	Nombre químico	Concentración (mM)	ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	λ Absorción (nm)	Disolver en
ABTS	Sal diamónica del ácido 2, 2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico) (SIGMA)	1	29,300	436	Etanol
DMP	2, 6-dimetoxifenol (SIGMA)	6	27,500	468	Etanol
Guayacol	Orto-metoxifenol (SIGMA)	60	26,600	470	Etanol
Siringaldazina	4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehido	0.1	65,000	520	Metanol

Preparación:

1. **ABTS** (PM=548.7, $\lambda=436$, **1 mM**): Pesar 0.00549 g y aforar a 10 ml con etanol
2. **DMP** (PM=154.17, $\lambda=468$, **6 mM**): Pesar 0.01 g de DMP y aforar a 10 ml con etanol
3. **Siringaldazina** (PM=360.37, $\lambda=526$, **0.1 mM**): Pesar 0.00036 g y aforar a 10 ml con metanol.
4. **Guayacol** (PM=124.14, $\lambda=450$, **60 mM**): Pesar 0.223 ml, y aforar a 30 ml con etanol

Los productos de la oxidación de los sustratos generan los siguientes colores: ABTS (verde-azul), DMP (Amarillo intenso), Siringaldazina (Fiusha) y Guayacol (café oxido claro).

III. Preparación de soluciones para geles nativos.

- **Acrilamida 40% (Bio-Rad, No. Cat. 161-0144)**

Fórmula: $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$

PM: $71.08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Se puede utilizar puro o se puede preparar, como se menciona a continuación: Pesar 40 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida, aforar a 100 ml con agua destilada. Guardar la solución en un frasco ámbar y almacenar a 4°C .

- **Buffer de Tris 1.5 M pH 8.8 (Sigma, No. Cat. T-6066)**

Fórmula: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3$

PM: $121.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Pesar 18.17 g de TRIS y disolverlos en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N, posteriormente aforar a 100 ml. Filtrar la solución con membrana de $0.22 \mu\text{m}$ y guardarla en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

- **Buffer de TRIS 0.5 M pH 6.8 (Sigma, No. Cat. T-6066)**

Pesar 6.06 g de TRIS y disolverlos en 50 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N, posteriormente aforar a 100 ml. Filtrar la solución con membrana de $0.22 \mu\text{m}$ y guardarla en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

- **Persulfato de amonio (APS) 10% (Sigma, No. Cat. A-3678)**

Pesar 0.5 mg de APS y disolverlos en 5 ml de agua destilada. Mantener a 4°C protegido de la luz.

- **TEMED (Bio-Rad, 161-0800)**

Se utiliza puro.

- **Buffer de carga**

Mezclar: 2.5 ml de Buffer de TRIS 0.5 M pH 6.8
2 ml de Glicerol (Sigma-Aldrich)
4 ml de agua bidestilada.
3 mg de Azul de Bromofenol (Sigma-Aldrich)

Aforar la mezcla a 15 ml con agua destilada.

- **Buffer de corrida (50 Mm TRIS + 380 Mm Glicina)**

Pesar 60.57 g de TRIS (Fisher scientific, BP152-1), 28.52 g de Glicina (Bio-rad, 161-0724) y aforar a 1 L con agua destilada. Filtrar con membrana de 0.22 μ m.