

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE HIBRIDOS DE CEPAS MEXICANAS
DE *Pleurotus ostreatus**

por Daniel Martínez-Carrera**,
Mercedes Sobal y Maricela Quirarte**

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HYBRIDS FROM MEXICAN
STRAINS OF *Pleurotus ostreatus*

SUMMARY

Three different Mexican strains of *Pleurotus ostreatus* from the Xalapa region, State of Veracruz, were crossed between them. Pairings amongst the strains INIREB-20 x 29 and INIREB-6 x 20 showed 100% compatibility, while the pairing of INIREB-6 x 29 showed 62.5%. Five different A factors, and six different B factors were determined in the studied fungi. The 12 hybrids examined showed different growth rates and colony densities in respect to the parental strains. These hybrids are considered as fertile.

RESUMEN

Se realizaron entrecruzamientos con 3 cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*, aisladas de la región de Xalapa, Veracruz. Los apareamientos entre las cepas INIREB-20 x 29 e INIREB-6 x 20 mostraron compatibilidad de 100%, mientras que las cepas INIREB-6 x 29 sólo un 62.5%. Se determinaron cinco diferentes factores A y 6 diferentes factores B en las cepas estudiadas. Se estudiaron 12 híbridos, los cuales mostraron diferencias entre sí en cuanto a velocidad de crecimiento y densidad de las colonias, así como con sus progenitores. Todos los híbridos pueden considerarse fértiles, en base a las condiciones de estudio.

INTRODUCCION

Una fase importante en el cultivo de los hongos comestibles, se refiere a la selección y adaptación de las cepas, ya que de esta manera se garantizará la cantidad y calidad de los cuerpos fructíferos producidos a escala masiva. Dicha

* Este trabajo fue financiado por el CONACYT, a través del Proyecto PCECBNA 020353, dirigido por el Dr. Gastón Guzmán en el INIREB.

** Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Laboratorio de Micología, Programa Flora de México, Apartado Postal 63, Xalapa, Ver., 91000.

selección, se lleva a cabo a través de un proceso biotecnológico a largo plazo, que implica un conocimiento detallado de la genética de la especie. *Pleurotus ostreatus* es un hongo comestible saprófito, que ha sido objeto de cultivo (Martínez-Carrera *et al.*, 1984). Tiene un ciclo sexual heterotálico tetrapolar (Eugenio y Anderson, 1968), es decir, la compatibilidad de los individuos está gobernada por dos pares de factores ($A_1 B_1$ y $A_2 B_2$) presentes en diferentes cromosomas y sólo aquellos con factores diferentes serán compatibles. De esta manera, los trabajos de mejoramiento deberán abocarse a una hibridación y selección dirigida de las progenies de las cepas.

El Proyecto Cultivo de Hongos Comestibles del INIREB, está desarrollando desde 1983 una línea de investigación sobre la selección de cepas nativas de hongos comestibles, para su adaptación al cultivo industrial. Como parte de dicha línea, en el presente trabajo se discuten los resultados de la caracterización de los híbridos obtenidos a partir del entrecruzamiento de 3 cepas de *P. ostreatus*.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 3 cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm., las cuales se muestran en la tabla 1. Estas cepas, INIREB-6, 20 y 29, se aislaron a partir de cuerpos fructíferos que crecían en forma silvestre sobre la pulpa de café en la región de Xalapa, Ver. Los especímenes estudiados se depositaron en la Sección Micológica del Herbario XAL del INIREB. Réplicas de dichas cepas se han enviado a la American Type Culture Collection (ATCC) de E.U.A., quedando registradas con los siguientes números: ATCC-56276, ATCC-56277 y ATCC-56279, respectivamente. Todas las cepas fueron mantenidas y sembradas en medio agar con extracto de malta (Bioxon).

La velocidad de crecimiento se estimó midiendo el diámetro alcanzado por las colonias cada 24 hrs, hasta que cubrían toda la caja de Petri. Para determinar los tipos de apareamiento de cada cepa, se utilizó el método descrito por Eger (1978), el cual consiste en determinar la compatibilidad de los monospóricos, después de su aislamiento y apareamiento, como se describe a continuación.

Se aislaron 15 micelios monospóricos de cada cepa, los cuales se aparearon entre sí, evitando las cruces recíprocas para determinar los 4 tipos de apareamiento (Fig. 1). Se consideró un apareamiento compatible cuando había presencia de fíbulas en la unión y en la periferia de las colonias apareadas, lo cual indica la formación de un dicarión, no así la ausencia de fíbulas que indicó incompatibilidad. Una vez determinados los tipos de apareamiento, se llevaron a cabo los cruzamientos interespecímen para determinar la compatibilidad entre los mismos, tomando un monospórico de cada tipo en cada cepa. Se entiende por cruzamientos interespecímen, aquellos apareamientos entre los cultivos monospóricos compatibles de distintos especímenes. Se hicieron apareamientos

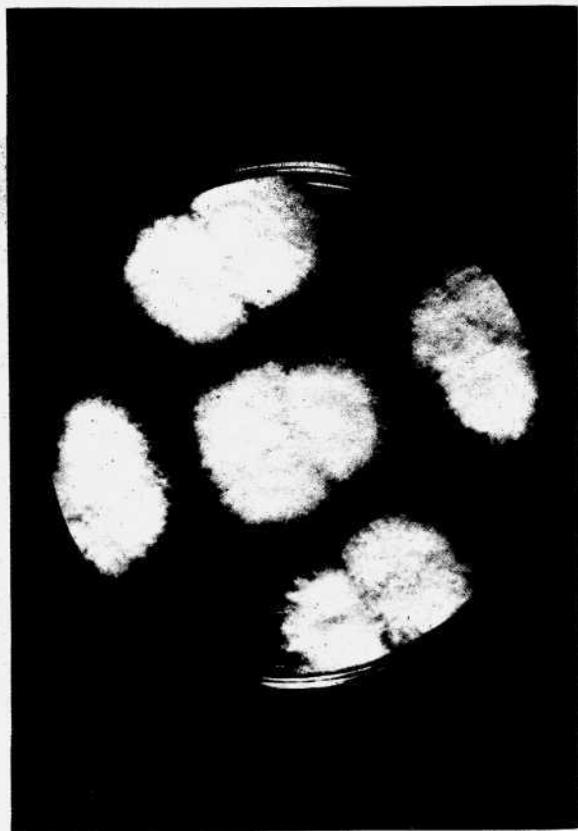


Figura 1. Entrecruzamientos de los aislamientos monospóricos, para la determinación de los tipos de apareamiento de las cepas de *Pleurotus ostreatus*.



Figura 2. Fructificaciones de un dicarión interespecímen, creciendo en frascos sobre arroz integral.

interespecímen, porque producen más cuerpos fructíferos que los intraespecímen, según observaciones de Eugenio y Anderson (1968).

Los híbridos y los progenitores se resembraron por triplicado y se incubaron a 28°C para caracterizarlos macroscópicamente, en base a la morfología que presentaban, como color, textura y velocidad de crecimiento.

Se utilizaron 2 métodos para comprobar si los dicariones obtenidos por hibridación, eran fértiles o estériles. El primero, consistió en hacer subcultivos de los híbridos en caja de Petri, con medio de agar con extracto de malta, colocados bajo condición de obscuridad e incubados a 28°C. Cuando el micelio colonizó todo el medio de cultivo, las colonias se colocaron en cámara húmeda y se expuso a la luz para la producción de primordios, tal como lo indicó Eger (1978). El segundo método consistió en resembrar los dicariones en frascos de 6 x 5 cm, con arroz integral esterilizado e incubados a 28°C en condición de obscuridad. Posteriormente, se expusieron a la luz y se les colocó independientemente en cámara húmeda, cuando el micelio colonizó completamente el arroz. Se consideraron cepas con alta probabilidad de ser fértiles, a los híbridos que formaron primordios y/o fructificaciones bajo estas condiciones, de acuerdo a lo mencionado por Eger (1974). En el caso de los híbridos que formaron cuerpos fructíferos diferenciados, con producción de basidiosporas, se hizo una dilución de sus esporas para observar su germinación en agua destilada y para comprobar su viabilidad; se aislaron nuevamente monospóricos sobre medio de cultivo a una temperatura de 28°C.

RESULTADOS

Los 15 aislamientos monospóricos divididos en los 4 tipos de apareamiento de cada cepa, se muestran en la tabla 2. Las cepas estudiadas desarrollaron micelio blanco amarillento, lanoso y poco denso. La cepa INIREB-6 presentó mayor velocidad de crecimiento determinado por el aumento del diámetro de la colonia, como se puede ver en la figura 3. Los 12 híbridos interespecímen obtenidos de las cepas anteriormente mencionadas, mostraron diferencias en la densidad de las colonias, como se muestra en la tabla 3, no así en color y textura, ya que todos presentaron micelio blanco, algodonoso y lanoso. En cuanto a velocidad de crecimiento, hubo variación dependiendo de cada híbrido y de las cepas entrecruzadas, el dicarion 10 x 40 de las cepas INIREB-6 x 20 mostró la mayor velocidad y densidad regular de la colonia, mientras que el dicarion 3 x 4 de las cepas INIREB-6 x 29 fue el más lento, pero con densidad micelial abundante (Fig. 4).

En la tabla 4 se muestran los cruzamientos de los 4 tipos de apareamiento de las cepas estudiadas. En los apareamientos INIREB-20 x 29 e INIREB-6 x 20, la compatibilidad fue de 100%, mientras que los apareamientos de las cepas INIREB-

TABLA 1. Cepas de *Pleurotus ostreatus* estudiadas en el presente trabajo.

ESPECIE	P R O C E D E N C I A		REGISTRO EN INIREB	REGISTRO EN ATCC*
	LOCALIDAD	SUBSTRATO		
<i>P. ostreatus</i>	Mahuixtlán, Coatepec, Ver.	Pulpa de café	INIREB-6	ATCC-56276
<i>P. ostreatus</i>	Las Animas, Xalapa, Ver.	Pulpa de café	INIREB-20	ATCC-56277
<i>P. ostreatus</i>	Las Animas, Xalapa, Ver.	Pulpa de café	INIREB-29	ATCC-56279

*American Type Culture Collection

TABLA 2. División de los aislamientos monospóricos de *Pleurotus ostreatus* en los 4 tipos de apareamiento de cada cepa estudiada.

CEPA	TIPO DE APAREAMIENTO	No. DE MONOSPORICOS
INIREB-6	A ₅ B ₅ (I)	11,5,12,16
	A ₅ B ₆ (II)	3,7,9,10
	A ₆ B ₅ (III)	13,14,17,24
	A ₆ B ₆ (IV)	2,4,6
INIREB-20	A ₁ B ₁ (I)	6,1,12,14
	A ₁ B ₂ (II)	4,25,46,50
	A ₂ B ₁ (III)	2,5,37,40
	A ₂ B ₂ (IV)	7,17,27
INIREB-29	A ₃ B ₃ (I)	6,4,7
	A ₆ B ₃ (II)	1,5,11,12
	A ₅ B ₄ (III)	13,16
	A ₆ B ₄ (IV)	2,3,8,9,10

TABLA 3. Caracterización morfológica macroscópica de los 12 híbridos formados por el apareamiento de tres cepas de *Pleurotus ostreatus* en el laboratorio.

CEPAS	No. DE MONOSPORICOS	CLASES DE IN-COMPATIBILIDAD	TIPOS DE APAREAMIENTO	DENSIDAD	CAPACIDAD DE FRUCTIFICACION
(20 x 29)	6 x 8	I - IV	A ₁ B ₁ x A ₆ B ₄	Regular	Fp
	2 x 4	III - I	A ₂ B ₁ x A ₃ B ₃	Regular	Ff
	1 x 5	I - II	A ₁ B ₁ x A ₆ B ₃	Regular	Ff
	7 x 3	IV - IV	A ₂ B ₂ x A ₆ B ₄	Escasa	Fp
(6 x 20)	3 x 7	II - IV	A ₅ B ₆ x A ₂ B ₂	Abundante	Fp
	7 x 5	II - III	A ₅ B ₆ x A ₂ B ₁	Regular	Fp
	11 x 6	I - I	A ₅ B ₅ x A ₁ B ₁	Regular	Fp
	11 x 40	II - III	A ₅ B ₆ x A ₂ B ₁	Regular	Fp
(6 x 29)	3 x 4	II - I	A ₅ B ₆ x A ₃ B ₃	Abundante	Ff
	14 x 2	III - IV	A ₆ B ₅ x A ₆ B ₄	Abundante	Ff
	6 x 7	IV - I	A ₆ B ₆ x A ₃ B ₃	Regular	Ff
	16 x 4	I - I	A ₅ B ₅ x A ₃ B ₃	Abundante	Ff

Fp = formación de primodios

Ff = formación de fructificaciones normales y producción de basidiosporas con capacidad de germinación.

TABLA 4. Entrecruzamiento de los 4 tipos de apareamiento de tres cepas de *Pleurotus ostrestus* en el laboratorio (+ = compatible y - = no compatible).

			INIREB-20				INIREB-6				# de cepa	# de monospórico	tipo de apareamiento	clase de entrecruzamiento
			6	7	50	5	11	2	3	14				
			A ₁ B ₁	A ₂ B ₂	A ₁ B ₂	A ₂ B ₁	A ₅ B ₅	A ₆ B ₆	A ₅ B ₆	A ₆ B ₅				
			I	IV	II	III	I	IV	II	III				
INIREB-29	4	A ₃ B ₃	I	+	+	+	+	+	+	+				
	10	A ₆ B ₄	IV	+	+	+	+	+	-	+				
	1	A ₆ B ₃	II	+	+	+	+	+	-	+				
	16	A ₅ B ₄	III	+	+	+	+	-	+	-				
INIREB-20	6	A ₁ B ₁	I					+	+	+				
	7	A ₂ B ₂	IV					+	+	+				
	50	A ₁ B ₂	II					+	+	+				
	5	A ₂ B ₁	III					+	+	+				

6 x 29, sólo fueron compatibles en un 62.5%. En el total de los apareamientos interespecímen se detectaron 5 diferentes factores A y 6 factores B diferentes.

Los 12 híbridos formados al entrecruzar los 4 tipos de apareamiento de cada cepa, mostraron formación de primordios (tabla 3), sin embargo, bajo las condiciones de estudio, sólo 6 fueron capaces de formar cuerpos fructíferos bien desarrollados con progenie viable (Fig. 2). La formación de primordios se observó en algunos casos tempranamente y en otros tardíamente, entre 3 y 30 días después de ser colocados en cámara húmeda.

DISCUSION

En general, las cepas al ser entrecruzadas producen híbridos que en su mayoría, son más densos y vigorosos que sus progenitores y en algunos casos, la velocidad de crecimiento es mayor (Fig. 4). La compatibilidad de un 100% observada entre las cepas INIREB-20 x 29 e INIREB-6 x 20, nos indica que los factores que controlan su sistema de incompatibilidad son diferentes como se observa en la tabla 2. En los apareamientos de las cepas INIREB-6 x 29, sólo compatibles en un 62.5%, la incompatibilidad ocurrida en 6 de sus apareamientos (tabla 4), se debe muy probablemente a la presencia de un factor común A en ambas cepas, algo similar a lo citado por Eugenio y Anderson (1968).

Eger (1974) consideró que los dicariones que no producen primordios después de un período de 10 días, eran cepas con una alta probabilidad de ser estériles. Tomando en cuenta esto, los 12 híbridos estudiados deben considerarse como fértiles. Al respecto, debe mencionarse que 3 de los dicariones obtenidos: el "2 x 4" (INIREB-20 x 29), el "3 x 7" (INIREB-6 x 20) y el "3 x 4" (INIREB-6 x 29), fueron probados a nivel de planta productora de hongos por Martínez-Carrera (1987), con el objeto de ver la producción de fructificaciones y eficiencia biológica. Dichos híbridos se cultivaron sobre pulpa de café con 5 días de fermentación y presentaron una eficiencia biológica de 113.01%, 115.01% y 118.36%, respectivamente. Se consideraron éstas como cepas de fructificación temprana, debido a que produjeron primordios entre 14 y 16 días después de su inoculación en el substrato. Estos resultados coinciden con los de Eugenio y Anderson (1968), que plantea que los híbridos interespecímen producen más cuerpos fructíferos que los intraespecímen.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Gastón Guzmán, del INIREB, la supervisión de este trabajo y al CONACYT por el financiamiento otorgado. A los Biólogos Conrado Soto y Rosa M^a Vela se les agradece su asistencia en el laboratorio. Uno de los autores (Martínez-Carrera), desea expresar además su más profundo

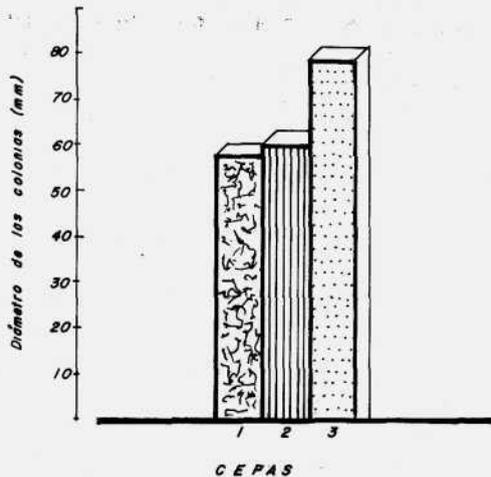


Figura 3. Velocidad de crecimiento de las tres cepas progenitoras de *Pleurotus ostreatus* a los 6 días de inoculación, incubadas a 28°C. 1 = INIREB-20, 2=INIREB-29 y 3=INIREB-6.

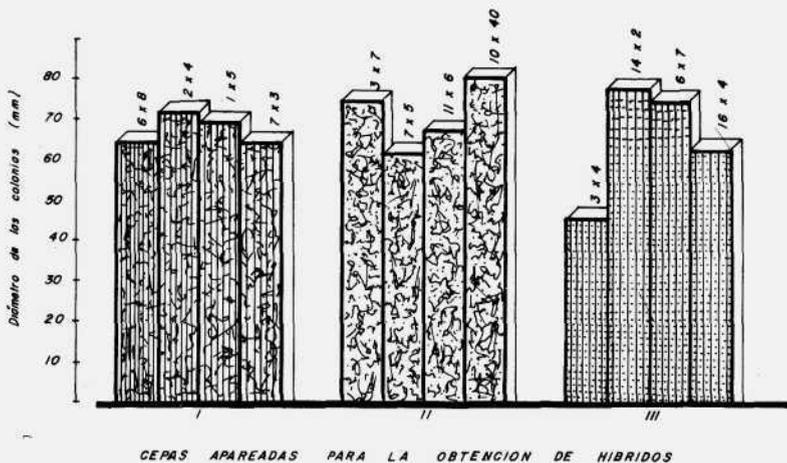


Figura 4. Velocidad de crecimiento de los 12 híbridos obtenidos a partir del apareamiento de tres cepas de *Pleurotus ostreatus* a los 6 días de inoculación, incubados a 28°C. I=INIREB-20 x 29, II=INIREB-6 x 20 y III=INIREB-6 x 29.

agradecimiento a la Dra. Gerlind Eger-Hummel del Instituto de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Marburgo, República Federal de Alemania, por su asesoría, atención y hospitalidad brindada durante la estancia del mismo en su laboratorio en 1983.

LITERATURA CITADA

- Eger, G., 1974. Rapid method for breeding *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Science* 9: 567-573.
- Eger, G., 1978. Biology and breeding of *Pleurotus*. In: Chang, S.T. y W.A. Hayes (Eds.), *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic Press, Nueva York.
- Eugenio, C.P. y N.A. Anderson, 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 60: 627-634.
- Martínez-Carrera, D., 1987. Mushroom farm to grow *Pleurotus* on coffee pulp. *Institution Journal for the Tropics* 7 (en prensa).
- Martínez-Carrera, D., M. Quirarte, C. Soto, D. Salmones y G. Guzmán, 1984. Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agro-industriales en México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 19: 207-219.