



Original

## Utilización de marcadores ITS e ISSR para la caracterización molecular de cepas híbridas de *Pleurotus djamor*



Leticia Aguilar Doroteo<sup>a</sup>, Paola Berenice Zárate Segura<sup>a</sup>, Ramón Villanueva Arce<sup>a</sup>, Jorge Yáñez Fernández<sup>a</sup>, María Eugenia Garín Aguilar<sup>b</sup>, Paula Cecilia Guadarrama Mendoza<sup>c</sup> y Gustavo Valencia del Toro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Cultivos Celulares, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, UPIBI, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, DF, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Farmacobiología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, México, México

<sup>c</sup> Instituto de Agroindustrias, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca, México

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 22 de septiembre de 2016

Aceptado el 12 de junio de 2017

#### Palabras clave:

ITS  
*Pleurotus*  
ISSR  
Híbridos

### R E S U M E N

**Antecedentes:** La caracterización molecular de cepas silvestres de *Pleurotus* es importante para la conservación del germoplasma y su posterior uso en la mejora genética. No se han realizado estudios moleculares con los monocariontes utilizados para la producción de cepas híbridas, ni de las cepas reconstituidas obtenidas al aparear tales monocariontes. Por consiguiente, la caracterización molecular de cepas dicarióticas parentales, híbridas y reconstituidas, así como de cepas monocarióticas, es de suma importancia.

**Objetivos:** Caracterizar molecularmente cepas dicarióticas silvestres e híbridas, así como cepas monocarióticas de *Pleurotus djamor*.

**Métodos:** Se recolectaron cinco cepas silvestres de *P. djamor* en diferentes estados de México y se identificaron molecularmente mediante la secuenciación de la región ITS1-5.8-ITS2 con los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4. Se seleccionaron dos cepas silvestres y se generaron cuatro cepas híbridas por apareamiento de neohaplontes compatibles. Para la caracterización molecular de las cepas monocarióticas y dicarióticas seleccionadas y producidas se utilizaron seis marcadores ISSR.

**Resultados:** Con los marcadores ITS se obtuvo un producto de amplificación de 700 pb en las cinco cepas silvestres con una similitud del 99–100% con la especie *P. djamor*. Con los marcadores ISSR se obtuvieron un total de 95 fragmentos con un 99% de polimorfismo.

**Conclusiones:** Las cepas silvestres se identificaron como *P. djamor*. Los marcadores ISSR generaron bandas polimórficas en las cepas monocarióticas y dicarióticas, y separaron ambos tipos de cepas. El alto grado de polimorfismo indica la diversidad genética de *P. djamor*, una ventaja para la producción de hongos y para la mejora de la especie.

© 2017 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Use of ITS and ISSR markers in the molecular characterisation of *Pleurotus djamor* hybrid strains

#### A B S T R A C T

**Background:** Molecular characterisation of wild type *Pleurotus* species is important for germplasm conservation and its further use for genetic improvement. No molecular studies have been performed with monokaryons used for producing hybrid strains, either with the reconstituted strains obtained by pairing those monokaryons. The molecular characterisation of parental dikaryons, hybrid, and reconstituted strains as well as monokaryotic strains, is therefore of utmost importance.

#### Keywords:

ITS  
*Pleurotus*  
ISSR  
Hybrids

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [gvovaltor@yahoo.com.mx](mailto:gvovaltor@yahoo.com.mx) (G. Valencia del Toro).

**Aims:** To carry out the molecular identification of *Pleurotus djamor* strains, i.e. dikaryotic wild type strains, hybrid strains, and the monokaryotic strains used for the hybrid formation.

**Methods:** Five wild type strains of *P. djamor* from different states in Mexico were collected and molecularly identified by sequencing the ITS1–5.8–ITS2 region using ITS1 and ITS4 universal oligonucleotides. Four hybrid strains were obtained by pairing neohaplonts of two wild type strains selected. Six ISSR markers were used for the molecular characterisation of monokaryotic and dikaryotic strains.

**Results:** Using the ITS markers, an amplified product of 700 bp was obtained in five wild type strains, with a 99–100% similarity with *P. djamor*. A total of 95 fragments were obtained using the ISSR markers, with 99% of polymorphism.

**Conclusions:** Wild type strains were identified as *P. djamor*, and were clearly grouped with Mexican strains from other states of Mexico. ISSR markers allowed the generation of polymorphic bands in monokaryotic and dikaryotic strains, splitting both types of strains. The high degree of polymorphism indicates the genetic diversity of *P. djamor*, an advantage in mushroom production and in the improving of the species.

© 2017 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Las cepas silvestres de hongos comestibles del género *Pleurotus* constituyen un material genético importante tanto para la subsistencia de los ecosistemas como para su posterior uso en la mejora genética de cultivos comerciales; por ello es necesaria la conservación y caracterización del germoplasma de estas especies. Una estrategia de mejora genética de cepas de hongos del género *Pleurotus* es la formación de cepas híbridas a partir de sus monocariontes, que se realiza a través de diferentes procesos: 1) germinación de las esporas de los cuerpos fructíferos<sup>13,14,26,27</sup>; 2) fusión de los protoplastos obtenidos al incubar el micelio dicariótico en soluciones enzimáticas<sup>6,15,19</sup> y 3) desdicarionización química, que implica la homogenización de los micelios dicarióticos y el posterior crecimiento en una solución peptona-glucosa para la recuperación de los monocariontes o neohaplontes<sup>16,23,24,30,31</sup>. Con el proceso de desdicarionización química ha sido posible la producción de cepas híbridas intraespecie, interespecie e incluso intergénero<sup>6,9,23,24,30,31</sup> y con ello se ha incrementado la probabilidad de la mejora genética de las especies implicadas.

Para la caracterización taxonómica molecular, el estudio de secuencias del ADN ha proporcionado información valiosa para varios grupos de basidiomicetos; en particular, la región ITS ha permitido el análisis de especies estrechamente relacionadas en muchos géneros, incluyendo especies de hongos cultivados<sup>5,18,25</sup>. Otra herramienta importante la constituye el uso de marcadores moleculares *inter simple sequence repeat* (ISSR), que tienen la ventaja de amplificar gran número de bandas polimórficas<sup>7</sup> y han sido eficientes en la detección de polimorfismos en cepas de *Pleurotus*<sup>8,19,33</sup>. Nuestro estudio tuvo como objetivo la caracterización molecular de cinco cepas silvestres de *Pleurotus* así como la de las cepas híbridas y cepas monocarióticas (obtenidas por desdicarionización) que fueron utilizadas para la producción de los híbridos.

## Materiales y métodos

### Material biológico

Las cepas silvestres de *Pleurotus* se recogieron en los años 2014 y 2015 en los estados de Hidalgo (CC053), Oaxaca (CC050 y CC051), Puebla (CC052) y San Luis Potosí (CC054). Las cepas de colección procedían del Instituto de Ecología A.C. (IE201, clave CC056), Colegio Posgraduados, Puebla (UAP9, clave CC059) y Facultad de Ciencias-UNAM (PCM, clave CC061). La cepa comercial se compró a un productor de México D.F. (CC055). Los cultivos axénicos de todas las cepas se encuentran depositados en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional en México.

### Obtención de cepas híbridas y reconstituidas

Las cepas híbridas se formaron a partir de los neohaplontes obtenidos de la cepa blanca CC050 y la cepa rosa CC051, ambas recogidas en Oaxaca. Las cepas híbridas y reconstituidas se obtuvieron a partir de neohaplontes generados por desdicarionización química<sup>16</sup> denominados CC051<sub>7</sub> (R7), CC051<sub>5</sub> (R5), CC051<sub>3</sub> (R3), CC051<sub>1</sub> (R1), CC050<sub>6</sub> (B6), CC050<sub>4</sub> (B4). Siguiendo el método descrito por Valencia del Toro et al.<sup>31</sup>, se obtuvieron las cepas híbridas que se denominaron CC051<sub>7</sub>xCC050<sub>4</sub> (R7B4), CC051<sub>5</sub>xCC050<sub>4</sub> (R5B4), CC051<sub>3</sub>xCC050<sub>4</sub> (R3B4), CC051<sub>1</sub>xCC050<sub>4</sub> (R1B4) y las reconstituidas CC051<sub>7</sub>xCC051<sub>1</sub> (R7R1) y CC050<sub>6</sub>xCC050<sub>4</sub> (B6B4).

### Extracción de ADN

Para la extracción del ADN genómico se siguió el protocolo Charge Switch gDNA Plant Kit (Invitrogen, EE. UU.). Se utilizaron 0,5 g de micelio recuperado por filtración y congelado, procedente de un cultivo líquido (EM 28 °C) de tres semanas de cada una de las cepas fúngicas.

### Amplificación y secuenciación de ADN

Para amplificar la región ITS-5.8-ITS2 del ADN de las cepas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron los oligonucleótidos universales ITS1 (TCGGTAGGTGAACCTGCCG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)<sup>1,2,11,26,34</sup>. La PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 µl, que contenía 43 µl de la mezcla de PCR SuperMix (Invitrogen, EE. UU.) y 7 µl con la siguiente composición: 10 ng de ADN total de cada cepa y, 0,1 µM de cada cebador ITS1 e ITS4. Para la amplificación de las cuatro cepas híbridas y reconstituidas se utilizó el equipo Sure Cyler 88000 Thermal Cyler (Agilent Technologies, EE. UU.) y la PCR se realizó con las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 55 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 40–60 °C durante 30 s, en función de cada marcador, elongación a 72 °C durante un minuto y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Se tomaron 5 µl de los productos de amplificación y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (1,5 h, 60 V, cámara de electroforesis Thermo EC Midicell® Primo™). Las muestras se examinaron en el fotodocumentador BioRad ChemiDoc™MP Imaging System y el número de pares de bases de cada banda se determinó por comparación con el marcador de 100 pb (Sigma) y 1 Kb plus (Invitrogen, EE. UU.). Los productos amplificados fueron purificados con PureLink PCR Purification (Invitrogen, EE. UU.). La secuenciación de los productos amplificados fue realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y cada muestra se secuenció en ambas direcciones.

**Tabla 1**Morfología del micelio y cuerpos fructíferos de las cepas de *Pleurotus* comerciales, de colección y silvestres

Micelio					Carpóforo			
N.º de registro	Color	Densidad	Textura	Crecimiento	Color	Laminas	Píleo	Estípite
CC050	Blanco	Regular	Algodonosa	Regular	Blanco	Decurrentes	Flabeliforme	Excéntrico
CC051	Rosa	Regular	Algodonosa	Regular	Rosa	Decurrentes	Flabeliforme	Excéntrico
CC052	Blanco	Alta	Algodonosa	Regular	Blanco	Decurrentes	Flabeliforme	Excéntrico
CC053	Blanco	Alta	Algodonosa	Regular	Blanco	Decurrentes	Flabeliforme	Excéntrico
CC054	Blanco	Alta	Algodonosa	Exuberante	Blanco	Decurrentes	Plano convexo	Excéntrico
CC055	Rosa	Regular	Filamentosa	Regular	Rosa	Decurrentes	Flabeliforme	Excéntrico
CC056	Blanco	Alta	Algodonosa	Regular	Blanco	Decurrentes	Flabeliforme	Excéntrico
CC059	Blanco	Alta	Algodonosa	Exuberante	Gris	Decurrentes	Liso convexo	Excéntrico
CC060	Blanco	Alta	Algodonosa	Exuberante	Beige	Decurrentes	Flabeliforme	Excéntrico
CC061	Blanco	Alta	Algodonosa	Exuberante	Beige	Decurrentes	Flabeliforme	Excéntrico

Las cepas CC050 a CC061 están depositadas en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la UPIBI (CC/UPIBI), del Instituto Politécnico Nacional de México.

### Análisis ISSR

De las cepas silvestres recogidas se seleccionaron los neohaplontes de la cepa blanca (CC050) y de la rosa (CC05051), y se efectuó la hibridación formando cuatro cepas híbridas y dos reconstituidas. Se utilizaron 6 iniciadores (ISSR) con las siguientes secuencias nucleotídicas: UBC807 (AGAGAGAGAGAGAGAGT), UBC811 (GAGAGAGAGAGAGAGAC), ISR02 (CAGCAGCAGCAGCAG), ISR11 (CACCACCACGC), ISR12 (GAGGAGGAGGC), ISR15 (GCAGCAGCACT). La mezcla para la PCR incluyó 30 ng de ADN de cada cepa, 2 µM del oligonucleótido, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 23 µl de PCR SuperMix (Invitrogen, EE. UU.), con un volumen final de 25 µl. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min y 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante un minuto, alineamiento durante un minuto a la temperatura de cada marcador, extensión a 72 °C durante 3 min y, finalmente, una extensión a 72 °C durante 10 min. La presencia de los productos de PCR fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en las mismas condiciones que las utilizadas para los marcadores ITS. Las muestras se examinaron en el fotodocumentador BioRad ChemiDoc™MP Imaging System y el número de pares de bases de cada banda se determinó por comparación con el marcador 100 pb (Sigma) y 1 Kb plus.

### Análisis de datos

Las secuencias obtenidas con los cebadores ITS fueron comparadas con las secuencias de *Pleurotus* publicadas en la base de datos de ADN (GenBank) mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Posteriormente las secuencias fueron alineadas con BioEdit Sequence Alignment Editor y el programa Mega 6.6 y se llevó a cabo un análisis taxonómico con el algoritmo Neighbour-Joining. Finalmente las secuencias quedaron depositadas en el GenBank.

Para el análisis de los productos obtenidos por ISSR las bandas se consideraron caracteres binarios y se evaluaron como presencia (1) o ausencia (0). La matriz de similitud se analizó a través de las distancias genéticas usando el coeficiente de Jaccard. El dendrograma se generó igualmente con el algoritmo Neighbour-Joining. Los análisis se realizaron con el programa NTSYSpc 2.1 y SPSS versión 22. El análisis de la eficacia de los cebadores, los perfiles genéticos de las cepas y el rendimiento de los cebadores se efectuó mediante el cálculo del contenido de información polimórfica, índice de marcador y el poder de resolución. También se calcularon los parámetros relación múltiple efectiva, loci polimórficos, loci no polimórficos y el poder de resolución de cada oligonucleótido<sup>22,32</sup>.

### Resultados

#### Determinación taxonómica de las cepas silvestres

Con base en su morfología (ver tabla 1), las cepas de *Pleurotus* nativas, comerciales y de colección incluidas en este estudio fueron identificadas taxonómicamente por el personal de la Colección de Macromicetos del herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME). En la tabla 2 se muestran los números de registro y el nombre científico asignado a cada cepa.

#### Análisis de secuencias de ITS

Con respecto al análisis molecular, en la región ITS de las cepas silvestres y de colección se obtuvo un solo producto de amplificación con un tamaño de 700–800 pb (fig. 1a). Las cepas silvestres y de colección se identificaron como *Pleurotus djamor* y *Pleurotus ostreatus* con una similitud del 99–100% (tabla 2).

Uno de los hallazgos de este estudio fue que las cinco cepas silvestres recogidas en Huajuapán de León, Oaxaca (CC050, CC051), Tlamanca de Hernández en Tepetzintla, Puebla (CC052), Tlanchinol, Hidalgo (CC053), Tamasopo y San Luis Potosí (CC054) fueron identificadas por los métodos moleculares como *P. djamor*. También una de las cepas de colección (CC056) y una comercial (CC055) correspondieron a la especie *P. djamor*. Otras dos cepas de colección (CC059 y CC061) fueron identificadas como *P. ostreatus* (tabla 2). Con las secuencias de ITS se elaboró el árbol filogenético (fig. 2) que permitió separar las especies de *Pleurotus* en grupos en función de las homologías de sus secuencias con aquellas del GeneBank. El grupo I, con *P. djamor*, estaba constituido por dos subgrupos, el A con un 88% de homología e integrado por la cepa comercial CC055 y la cepa *P. djamor* var. *roseus* (aislamiento ABM1049204 de la región de Malasia) y el subgrupo B, con una homología del 99%, que englobaba las cepas silvestres CC053, CC056, CC054, CC052, CC051 y CC050, en conjunto con la cepa ECS0162 del estado de Morelos y las cepas ECS0151 y ECS0150 provenientes de Chiapas. El grupo II estaba formado únicamente por *Pleurotus cystidiosus* subespecie *abalonus* (cepa IFO31074 de Japón). El grupo III quedó conformado por *Pleurotus citrinopileatus* (cepa S034 de China), y en el grupo IV, con una homología del 97%, se situó *P. ostreatus* con las cepas de colección CC059 y CC061 junto con la cepa 6689 de Austria y la cepa PAK1 de Malasia. Finalmente, el grupo V tuvo la especie *Fusarium phyllophilum* como grupo externo.

#### Análisis de ISSR

Los seis marcadores ISSR utilizados mostraron una alta capacidad para generar bandas de ADN polimórfico amplificado (ver

**Tabla 2**  
Número de acceso de las cepas de *Pleurotus* comerciales, de colección y silvestres utilizadas para el estudio

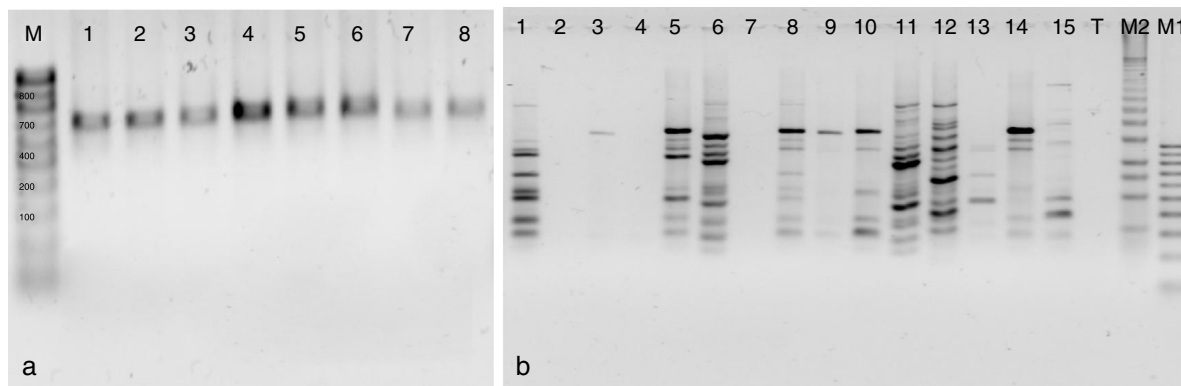
N.º de registro (CC/UPIBI)	Origen	N.º de registro (FCME)	Determinación taxonómica	Determinación molecular (% índice de similitud) <sup>a</sup>	Número de acceso GenBank <sup>b</sup>
CC050	Huajuapán de León Oaxaca	26233	<i>Pleurotus djamor</i> var. <i>roseus</i>	<i>Pleurotus djamor</i> (99%)	KX573921
CC051	Huajuapán de León Oaxaca	26233	<i>Pleurotus djamor</i> var. <i>roseus</i>	<i>Pleurotus djamor</i> (100%)	KX573922
CC052	Tlamanca de Hernández, Tepetzintla, Puebla	26235	<i>Pleurotus opuntiae</i>	<i>Pleurotus djamor</i> (99%)	KX573923
CC053	Tlanchinol Hidalgo	26236	<i>Pleurotus aff. levis</i>	<i>Pleurotus djamor</i> (99%)	KX573924
CC054	Tamasopo San Luis Potosí	26234	<i>Pleurotus djamor</i> var. <i>djamor</i>	<i>Pleurotus djamor</i> (99%)	KX573925
CC055	Productor D. F.	Comercial	<i>Pleurotus</i> sp.	<i>Pleurotus djamor</i> (99%)	KX573926
CC056	Instituto de Ecología A. C.	Colección	<i>Pleurotus djamor</i> var. <i>salmonostramineus</i>	<i>Pleurotus djamor</i> (100%)	KX573927
CC059	Colegio de Posgraduados, Puebla	Colección	<i>Pleurotus djamor</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> (100%)	KX573928
CC060	UPIBI, IPN	Colección	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> (100%)	KX573929
CC061	F. Ciencias, UNAM	Colección	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	<i>P. ostreatus</i> f. <i>florida</i> (100%)	KX573930

Las cepas CC055 a CC061 son cepas depositadas en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la UPIBI (CC/UPIBI), del Instituto Politécnico Nacional de México.

FCME: Colección de Macromicetos del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, México.

<sup>a</sup> Porcentaje de similitud al comparar las secuencias obtenidas con aquellas del GenBank.

<sup>b</sup> Número de acceso con el que fueron enviadas las secuencias al GenBank.



**Figura 1.** a) Productos amplificados del ADN de las cepas de *Pleurotus* mediante cebadores ITS. Calle M: marcador molecular, calle 1: CC052, calle 2: CC051, calle 3: CC056, calle 4: CC054, calle 5: CC053, calle 6: CC055, calle 7: CC050, calle 8: CC059. b) Productos amplificados mediante el oligonucleótido UBC811 para las cepas de *Pleurotus* parentales, híbridas, reconstituidas y neohaplontes. Marcadores moleculares M1 (100 pb) y M2 (1 Kb plus), calle 1: CC050, calle 2: CC051, calle 3: R7B4, calle 4: R5B4, calle 5: R3B4, calle 6: R1B4, calle 7: R7R1, calle 8: B6B4, calle 9: R7, calle 10: R5, calle 11: R3, calle 12: R1, calle 13: B6, calle 14: B4, calle 15: R1, calle 16: Testigo (T).

fig. 1b y tabla 3). En total se visualizaron 95 productos de amplificación; los seis oligonucleótidos ISSR amplificaron fragmentos en las 14 cepas estudiadas, con un número de fragmentos amplificados que van desde 13 (ISR15) hasta 21 (ISR11). El oligonucleótido ISR11 presentó el mayor poder de resolución (11,57). El promedio de polimorfismo obtenido con los seis marcadores utilizados fue del 99% y los tamaños de las bandas se situaron entre 100 y 4.000 pb. El valor más alto en el contenido de información polimórfica fue de 0,37 para el oligonucleótido ISR02, mientras que el menor valor (de 0,31) fue para el oligonucleótido ISR12; no obstante, este marcador presentó el valor más alto (7,48) en la relación múltiple efectiva. El valor promedio del índice de marcador fue de 2,41; el valor más alto (2,65) fue para el oligonucleótido ISR02 y el más bajo el del oligonucleótido UBC807 (2,1).

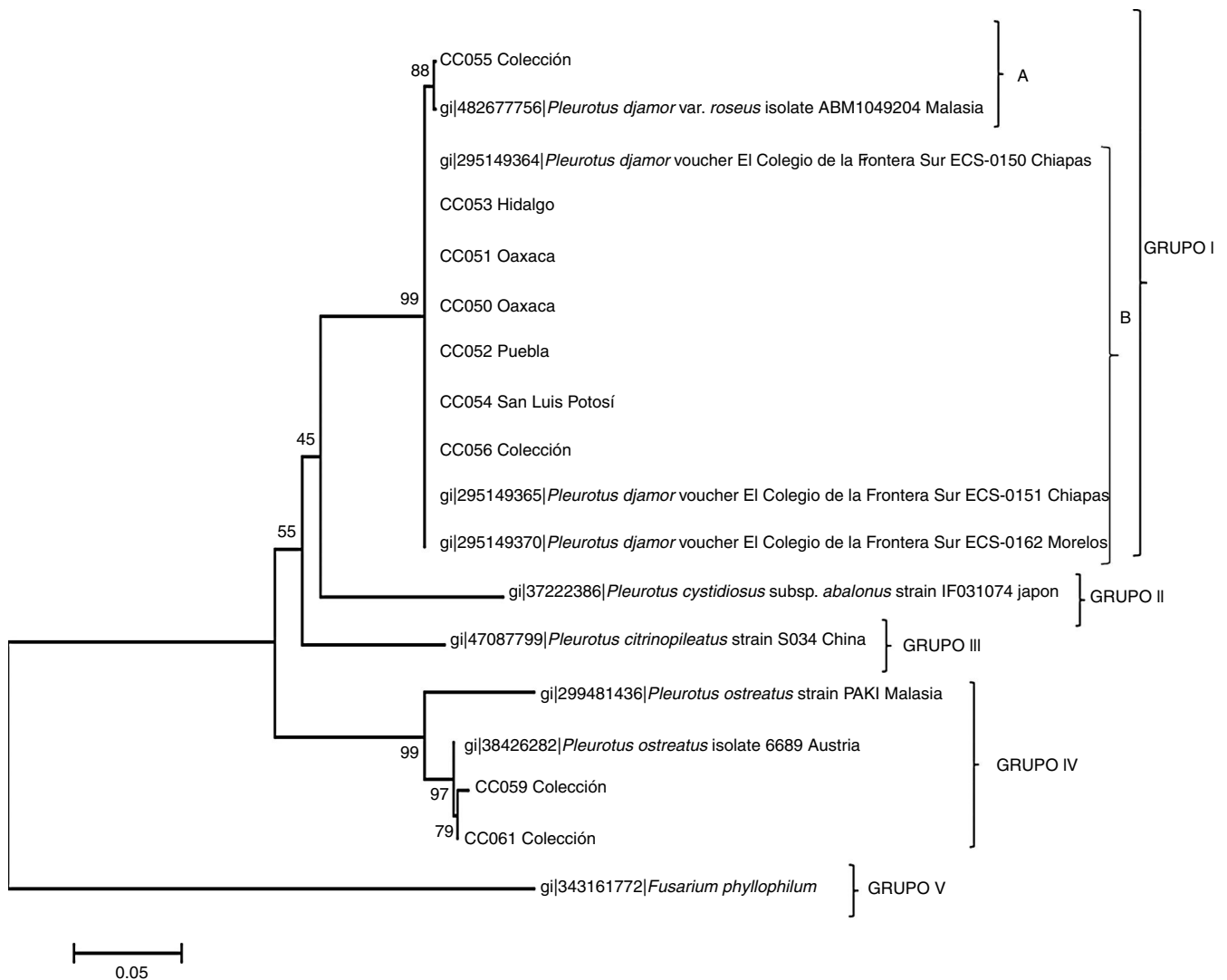
La figura 3 muestra el dendrograma basado en los datos obtenidos con los seis marcadores ISSR. Las 14 cepas se dividieron en cinco grupos. El primer grupo estuvo conformado por las ocho cepas dicarióticas: las cepas parentales silvestres CC050 (cepa blanca) y CC051 (cepa rosa), las cepas híbridas R3B4, R1B4, R7B4 y R5B4, y las cepas reconstituidas R7R1 y B6B4. El segundo grupo lo formó la cepa monocariótica B6 (proveniente de la cepa parental blanca CC050). El tercer grupo lo integraron tres neohaplontes (R7, R5 y R3) provenientes de la cepa parental rosa (CC051). El cuarto grupo lo constituyó el neohaplonte B6 (proveniente de la cepa parental

blanca CC050); el neohaplonte R1 (proveniente de la misma cepa parental rosa) conformó el grupo cinco.

## Discusión

La amplificación de la región ITS del ADN de las cinco cepas silvestres, tres cepas de colección y una cepa comercial con los cebadores ITS1 e ITS2 permitió obtener un fragmento único de 700 pb. Estos datos son consistentes con los obtenidos por Zervakis et al.<sup>36</sup> para las cepas de *Pleurotus abalonus*, *P. cystidiosus*, *P. cystidiosus* var. *formosensis*, *Pleurotus fuscoquamus*, *Pleurotus smithii* y *Pleurotus australis*. Asimismo, Imtiaj et al.<sup>12</sup> obtuvieron fragmentos de 600–800 pb en cepas de *P. djamor*, *Pleurotus cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ferulae*, *Pleurotus nebrodensis*, *P. ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*. Es evidente que el número de pares de bases obtenido con las cepas analizadas en el presente estudio se encuentra en el intervalo reportado para especies del género *Pleurotus*. Por otro lado, es importante señalar que, al secuenciar estos productos de amplificación, las cepas de *Pleurotus* estudiadas quedaron identificadas en dos especies diferentes, *P. djamor* y *P. ostreatus*, y que estos resultados difieren de los obtenidos sobre la base de los caracteres morfológicos. El análisis molecular de las cepas silvestres CC052 y CC053 indicó que ambas corresponden a *P. djamor* y morfológicamente fueron identificadas como *Pleurotus opuntiae* y *Pleurotus levis*, respectivamente (ver tabla 2). Una situa-





**Figura 2.** Árbol filogenético generado por análisis de Neighbour-joining a partir de las secuencias de la región ITS de cepas de *Pleurotus*.

**Tabla 3**

Parámetros de eficiencia genética de los marcadores ISSR utilizados

Primer	T <sup>a</sup> (°C)	TB	PB	MB	PPB (%)	PIC	EMR	MI	RP
ISR02	56,3	14	14	0	100	0,37	7,07	2,65	8,71
ISR15	56,3	13	13	0	100	0,36	6,42	2,35	7,14
ISR12	55	18	17	1	94,4	0,31	7,48	2,34	7,85
ISR11	55	21	21	0	100	0,36	7,21	2,63	11,57
UBC811	53,2	14	14	0	100	0,35	6,64	2,34	7,57
UBC807	63,8	15	15	0	100	0,35	5,92	2,12	8,42
Total		95	94	1					
Promedio		15,83	15,67	0,17	99,07	0,36	6,79	2,41	8,55

EMR: relación múltiple efectiva; MB: número de loci monomórficos; MI: índice de marcador; PB: número de loci polimórficos; PIC: contenido de información polimórfica; PPB: porcentaje de bandas polimórficas; RP: poder de resolución; TB: bandas totales.

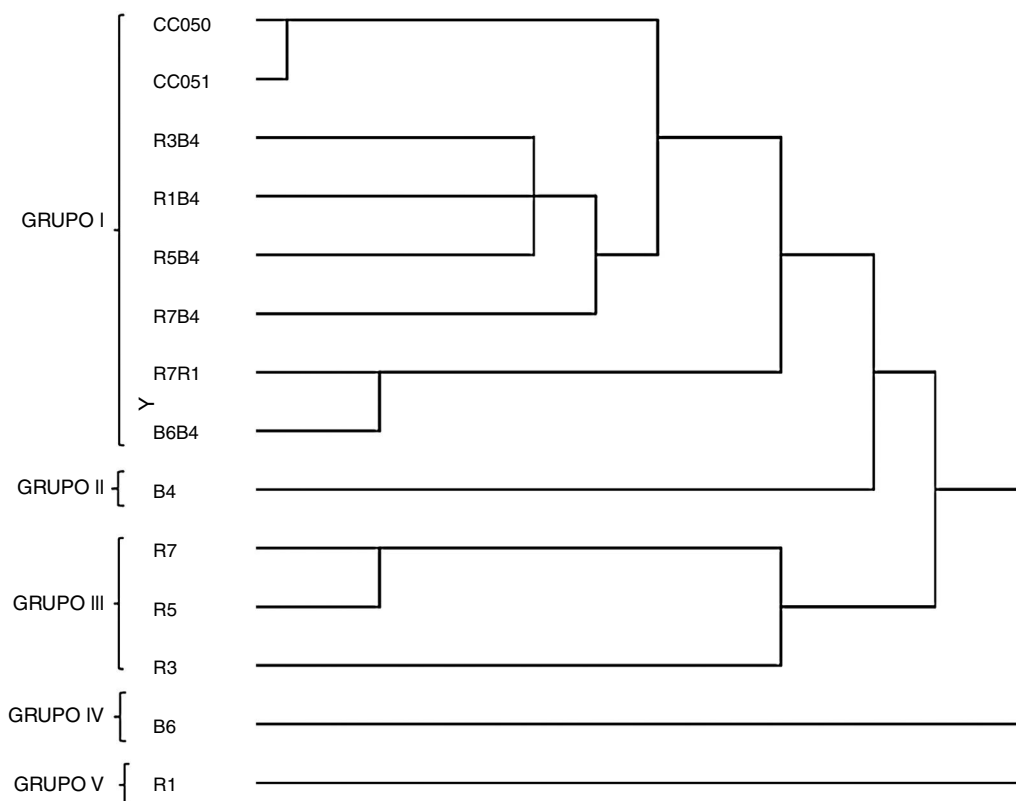
ción similar tuvo lugar con las cepas de colección CC055 y CC056, que morfológicamente se identificaron como *P. pulmonarius*, mientras que el estudio molecular las identificó como *P. ostreatus*.

La utilización de marcadores ISSR permitió detectar una amplia diversidad genética de las cepas de *P. djamor* utilizadas, con polimorfismos del 99% y 15,8 bandas de promedio por cebador. Otros autores han documentado también una alta diversidad genética en otras especies del género *Pleurotus*; así, Ying et al.<sup>35</sup> obtuvieron valores promedio de polimorfismo del 74,6%, con 10,6 bandas

por cebador para diferentes cepas de *P. pulmonarius*, mientras que Wang et al.<sup>33</sup> obtuvieron un porcentaje promedio de polimorfismo del 84,3%, con 16,2 bandas por cebador en cepas de *P. eryngii*. Zhang et al.<sup>37</sup>, al utilizar once marcadores ISSR en cepas de *Pleurotus citrinopilatus*, encontraron un polimorfismo del 82,9%, con 10,5 bandas por cebador. También para cepas de *Pleurotus florida*, *Lentinula edodes* y los híbridos formados entre ellos se han encontrado polimorfismos del 98,4%, con 11 bandas promedio por cebador<sup>19</sup>.

Los marcadores ISSR fueron una herramienta útil al unirse a diferentes sitios del ADN genómico de las cepas analizadas y generar un alto grado de bandas polimórficas. Los oligonucleótidos ISR02 e ISR11 presentaron los valores más altos de contenidos de información polimórfica (0,37 y 0,36, respectivamente) y de poder de resolución (8,71 y 11,57, respectivamente), y tienen un alto potencial para estudios adicionales que permitan investigar más ejemplares o sitios de muestreo con un número reducido de cebadores<sup>22,38</sup>.

Además de realizar la determinación molecular de las cepas silvestres, otro propósito de este trabajo fue utilizar los marcadores ISSR con la finalidad de poder caracterizar molecularmente las cepas dicarióticas híbridas, parentales y reconstituidas de *P. djamor*. Se esperaba que todas las cepas dicarióticas presentaran los mismos patrones de bandas y se ubicaran en un mismo grupo en el dendrograma elaborado, lo que efectivamente observamos al



**Figura 3.** Dendrograma elaborado mediante el algoritmo de agrupamiento del vecino más cercano (Neighbour-Joining) de las cepas de *Pleurotus* parentales (CC051 y CC052), reconstituidas (R7R1 y B6B4), híbridas (R3B4, R1B4, R5B4 y R7B4), neohaplontes (B4 y B6) de la cepa blanca y neohaplontes (R1, R3, R5 y R7) de la cepa rosa.

situarse en el primer grupo (fig. 3) las cepas dicarióticas, con el subgrupo de las cepas híbridas (R3B4, R1B4, R5B4 y R7B4) como el más cercano a las cepas parentales CC050 y CC051; el subgrupo de las cepas reconstituidas (R7R1 y B6B4) se encontró más distante. Una situación similar se presentó en el trabajo de Avin et al.<sup>4</sup>, con un dendrograma en el que las cepas dicarióticas parentales e híbridas de *P. pulmonarius* se situaron en el mismo grupo. Es importante precisar que las dos cepas silvestres de *P. djamor* se ubicaron en el mismo subgrupo, a pesar de que el color de los cuerpos fructíferos de la cepa CC050 es blanco y los de la cepa CC051, rosa (ver tabla 1). Las cepas monocarióticas o neohaplontes obtenidas por descariotización química se situaron en un grupo independiente, lo que llevó a la separación de las cepas monocarióticas (neohaplontes) con respecto a las dicarióticas (híbridas, parentales y reconstituidas), hecho que coincide con lo observado por otros investigadores en cepas de *Agaricus bisporus*: con los oligonucleótidos ISSR se generaron dendrogramas en los que claramente se separan las cepas monocarióticas de las dicarióticas<sup>20,29</sup>. En cepas de *Pleurotus* se han utilizado diferentes marcadores para detectar cepas monocarióticas; en *P. sajor-caju* se utilizaron marcadores RAPD<sup>10</sup>; para *P. ostreatus* var. florida, *P. djamor* var. roseus y los híbridos formados a partir de estas cepas se utilizaron marcadores RFLP<sup>28</sup>, y en *P. pulmonarius* se han utilizado marcadores ISSR para secuencias del espaciador intergénico 2 (IGS2)<sup>3</sup>. En este estudio fue posible agrupar las cepas monocarióticas fuera del grupo de las cepas dicarióticas. Por otro lado, es importante resaltar que, a su vez, las cepas monocarióticas se separaron en diferentes grupos, por lo que se requieren estudios con mayor número y diferente tipo de cepas monocarióticas (neohaplontes y monospóricos) para así determinar la posible pérdida de bandas en estos componentes, como se ha reportado con anterioridad<sup>20,29</sup>.

También es importante indicar que con los oligonucleótidos utilizados fue posible la amplificación de bandas polimórficas

para cepas monocarióticas de *Pleurotus*. En general, este estudio demostró la utilidad de los marcadores ISSR para el análisis de homocariotes y heterocariotes en cepas de *P. djamor*.

Aunque los estudios previos registran la existencia de *P. djamor* en los estados de Chiapas, Yucatán y Tabasco (zona sur), Puebla, Morelos y Michoacán (zona centro), Veracruz (este), Jalisco (oeste)<sup>15</sup> y la región sur del estado de Oaxaca<sup>17</sup>, los trabajos realizados demuestran la distribución de la especie por todo el país. También es valioso indicar que las cepas CC053 y CC054 de Hidalgo y San Luis Potosí, respectivamente, son registros nuevos de la especie *P. djamor*. Respecto a las cepas CC050 y CC051 de la región Mixteca de Oaxaca, el registro anterior fue de la Sierra Sur de Oaxaca<sup>17</sup>; como no estaba documentada la presencia de *P. djamor* para Huajuapán de León, este también es el primer registro en esta zona. La cepa CC052 de la Sierra Norte de Puebla es registrada por primera vez en la zona de Tepetzintla y fue documentada con anterioridad en el altiplano del municipio de Atlixco<sup>11</sup>. Teniendo en cuenta el origen de las cepas evaluadas, puede afirmarse que *P. djamor* es una especie ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales de México<sup>11,21</sup>.

La alta diversidad genética obtenida en las cepas dicarióticas y monocarióticas de *P. djamor* puede ser explicada por el hecho de que se trabajó con cepas silvestres, que presentan genotipos adaptados al medio ambiente natural<sup>37</sup>. Por otro lado, la gran variabilidad genética de las cepas utilizadas es importante para los programas de mejora genética.

## Conclusiones

El uso de los marcadores ITS permitió la identificación molecular de las cepas silvestres de *Pleurotus*, que forman un grupo inter-estéril *P. djamor*. Con la obtención del árbol filogenético se observó la relación entre las cepas silvestres y las cepas de *P. djamor*

previamente recogidas en diferentes regiones de México, lo que puso en evidencia la presencia de esta especie en varias regiones de nuestro país.

Los oligonucleótidos ISSR utilizados llevaron a la amplificación del ADN de *P. djamor* tanto en las cepas dicarióticas como en las monocarióticas, lo que permitió su separación. El alto polimorfismo de estas cepas puso en evidencia la diversidad genética de *P. djamor*, que puede utilizarse en la producción comercial y en programas de mejoramiento genético.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en relación con el contenido de este manuscrito.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido apoyado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN: 20160240).

Se agradece el apoyo brindado por los investigadores Dr. Joaquín Cifuentes Blanco y Biól. Lilia Pérez Ramírez, de la Colección de Macromicetos del herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME), por la caracterización taxonómica de las cepas de *Pleurotus*.

### Bibliografía

- Ahmadi AF, Bhassu S, Yee ST, Sabaratnam V. Molecular classification and phylogenetic relationships of selected edible Basidiomycetes species. *Mol Biol Rep*. 2012;39:7355–64.
- Alam N, Shim MJ, Lee MW, Shin PG, Yoo YB, Lee TS. Phylogenetic relationship in different commercial strains of *Pleurotus nebrodensis* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology*. 2009;37:183–8.
- Avin FA, Bhassu S, Tan YS, Vikineswary S. DNA Pedigree tracking to identify compatible mating partners of *Pleurotus pulmonarius*. *J Animal Plant Sci*. 2014;24:1–7.
- Avin FA, Bhassu S, Rameeh V, Tan YS, Vikineswary S. Genetics and hybrid breeding of *Pleurotus pulmonarius*: Heterosis, heritability and combining ability. *Euphytica*. 2016;209:85–102.
- Calvo BL. Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas. En: Sánchez E, Roysse D, editores. *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* México, D.F.: ECOSUR; 2001. p. 71–9.
- Chakraborty U, Sikdar SR. Production and characterization of somatic hybrids raised through protoplast fusion between edible mushroom strains *Volvariella volvacea* and *Pleurotus florida*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24:1481–92.
- Culley MT, Wolfe AD. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (*Violaceae*), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*. 2001;86:545–56.
- Fu LZ, Zhang HY, Wu XQ, Li HB, Wei HL, Wu QQ, et al. Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD ISSR and SRAP markers. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26:709–16.
- Guadarrama MPC, Valencia TG, Ramírez CR, Robles MF, Yáñez FJ, Garín AME, et al. Morphology and mycelial growth rate of *Pleurotus* spp. strains from the Mexican mixtec region. *Braz J Microbiol*. 2014;45:861–72.
- Gupta B, Niranjan BP, Anil R, Kotasthane S. Molecular characterization and mating type analysis of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) using single basidiospores for strain improvement. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011;27:1–9.
- Huerta G, Martínez CD, Sánchez JE, Lara LH, Vilgalys R. Genetic relationships between Mexican species of *Pleurotus* analyzing the ITS-region from rDNA. *Micol Apl Int*. 2010;22:15–25.
- Imtiaj A, Lee TS, Ohga S. Sequence variation of *Pleurotus* species collected from Eastern Asia. *Micol Apl Int*. 2011;23:1–10.
- Isikhumhen OS, Moncalvo JM, Nerud F, Vilgalys R. Mating compatibility and phylogeography in *Pleurotus tuberregium*. *Mycol Res*. 2000;104:732–7.
- James YT, Liou SR, Vilgalys R. The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom *Pleurotus djamor*. *Fungal Genet Biol*. 2004;41:813–25.
- Larraya L, Peñas MM, Pérez G, Santos C, Ritter E, Pisabarro GA, et al. Identification of incompatibility alleles and characterisation of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr Genet*. 1999;34:486–93.
- Leal LH, Eger HG. A monokaryotization method and its use for genetics studies in wood rotting basidiomycetes. *Theor Appl Genet*. 1982;61:65–8.
- León AH, Martínez GR, Caballero GP, Martínez C. Caracterización de dos cepas de *Pleurotus djamor* nativas de Oaxaca México. *Rev Mex Cienc Agríc*. 2013;86:1285–91.
- Liu Y, Wang S, Yin Y, Xu F. Evaluation of genetic diversity of Chinese *Pleurotus ostreatus* cultivars using ADN sequencing technology. *Ann Microbiol*. 2012;63:571–6.
- Mallik P, Sikdar RS. Production and molecular characterization of somatic hybrids between *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014;30:2283–93.
- Nazrul MI, YinBing B. Differentiation of homokaryons and heterokaryons of *Agaricus bisporus* with inter-simple sequence repeat markers. *Microbiol Res*. 2011;166:226–36.
- Petersen HR, Hughes WK. Some agaric distribution patterns involving Pacific Indmasses and Pacific Rim. *Mycoscience*. 2007;48:1–14.
- Prevost A, Wilkinson MJ. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet*. 1999;98:107–12.
- Ramírez CR, Hernández VO, Galván PF, Leal LH. Productividad de cepas híbridas de *Pleurotus x Lentinula*. En: Sánchez VJ, Martínez CD, Mata G, Leal LH, editores. *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*: Tapachula El Colegio de la Frontera Sur; 2007. p. 55–64.
- Ramírez-Carrillo R, Leal LH. Symmetrical recovery of monokaryotic components from *Lentinula edodes* using dedikaryotization. *Mush Biol Mush Prod*. 2002:141–9.
- Ro H, Kim SS, Ryu JS, Jeon C, Lee TS, Lee HS. Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis RAPD fingerprinting, and physiological characteristics. *Mycol Res III*. 2007:710–5.
- Rosnina AG, Tan YS, Abdullah N, Vikineswary S. Morphological and molecular characterization of yellow oyster mushroom *Pleurotus citrinopileatus*, hybrids obtained by interspecies mating. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32:18, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-015-1959-2>
- Salmones D, Mestizo VL, Gaitán HR. Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn. *Rev Mex Micol*. 2014;18:21–6.
- Selvakumar P, Rajasekar S, Babu AG, Periasamy K, Raaman N, Reddy MS. Improving biological efficiency of *Pleurotus* strain through protoplast Fusion between *P. ostreatus* var. *florida* and *P. djamor* var. *roseus*. *Food Sci Biotechnol*. 2015;24:1741–8.
- Sharma M, Suman BC, Gupta D. Characterization of single spore isolates of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach using conventional and molecular methods. *Curr Microbiol*. 2014;69:474–83.
- Valencia del Toro G, Leal LH. Estudio de compatibilidad entre cepas de *Pleurotus* spp. con cuerpos fructíferos de diversos colores. *Rev Mex Micol*. 1999;15:65–71.
- Valencia del Toro G, Leal LH. Fruit body color in *Pleurotus* spp. hybrid strains obtained by mating of compatible neohaplonts. *Mush Biol Mush Prod*. 2002:151–9.
- Varshney RK, Chabane K, Hendre PS, Aggarwal RK, Graner A. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Sci*. 2007;173:638–49.
- Wang S, Yin Y, Liu Y, Xu F. Evaluation of genetic diversity among Chinese *Pleurotus eryngii* cultivars by combined RAPD/ISSR marker. *Curr Microbiol*. 2012;65:424–31.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editores. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Nueva York: Academic Press, Inc; 1990. p. 315–22.
- Yin Y, Liu Y, Li H, Zhao S, Wang S, Liu Y, et al. Genetic diversity of *Pleurotus pulmonarius* revealed by RAPD ISSR, and SRAP fingerprinting. *Curr Microbiol*. 2014;68:397–403.
- Zervakis GI, Moncalvo JM, Vilgalys R. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology*. 2004;150:715–26.
- Zhang QS, Xu BL, Liu L, Yuan QQ, Dong HX, Cheng XH, et al. Analysis of genetic diversity among Chinese *Pleurotus citrinopileatus* singer cultivars using two molecular marker systems (ISSRs and SRAPs) and morphological traits. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012;28:2237–48.
- Zhang J, Xie W, Wang Y, Zhao X. Potential of sard codon targeted (SCoT) markers to estimate genetic diversity and relationships among Chinese *Elymus sibiricus* accessions. *Molecules*. 2015;20:5987–6001.