



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE TLAXCALA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO FISIOLÓGICO DE *PLEUROTUS OSTREATUS*
DESARROLLADO SOBRE MEDIOS DE CULTIVO
PREPARADOS CON MEZCLAS DE PAJA Y TRIGO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
I.Q. EDUARDO SAINOS CARRILLO

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MA. DEL CARMEN SANCHEZ HERNANDEZ

TUTORES:
**DR. GERARDO DIAZ GODINEZ
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL**

FINANCIAMIENTO

Este trabajo se realizó en el área de inóculos del Laboratorio de Biotecnología y en la Planta Piloto del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

El financiamiento corrió a cargo de dicho centro.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
Secretaría de Investigación Científica y de Posgrado
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Maestría en Ciencias Biológicas

Tlaxcala, Tlax., a 9 de Diciembre de 2004

DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ
COORDINADORA DE LA MAESTRÍA
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Universidad Autónoma de Tlaxcala
Presente

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que el I. Q. **EDUARDO SAINOS CARRILLO** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen profesional correspondiente. El título que llevará es: "Estudio fisiológico de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre medios de cultivo preparados con mezclas de paja y trigo".

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dr. Octavio Loera Corral

Dra. Guadalupe Santiago Martínez

Dr. Daniel Martínez Carrera

Dr. Porfirio Morales Almora

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria.

Al Instituto Tecnológico Agropecuario de Xocoyucan, Tlaxcala por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado:

Dra. Maria del Carmen Sánchez Hernández

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dr. Octavio Loera Corral

Dra. Maria Guadalupe Santiago Martínez

Dr. Daniel Martínez Carrera

Dr. Porfirio Morales Almora

Con el reconocimiento profundo a mi Directora de Tesis Dra. Maria del Carmen Sánchez Hernández y a mis asesores Doctores Gerardo Díaz Godínez y Octavio Loera Corral

RESUMEN

En esta investigación se estudió la fisiología de la cepa de *Pleurotus ostreatus* (3526 de la colección Northern Regional Research Center, Illinois, USA.) desarrollada sobre agar con mezclas de extractos de paja (P) y trigo (T), así como sobre mezclas de P y T. Las mezclas utilizadas en ambos medios de cultivo presentaron las siguientes proporciones (%): 100 P (M1), 75 P + 25 T (M2), 50 P + 50 T (M3), 25 P + 75 T (M4) y 100 T (M5). En los medios preparados con agar y extractos se evaluó la velocidad de crecimiento radial y en los sustratos de P y T se midió la velocidad de crecimiento longitudinal. En el micelio desarrollado en todos los medios de ambos sistemas experimentales, se determinó la actividad enzimática intracelular de proteasas, glucanasas, lacasas, así como el contenido de proteína soluble y la humedad. También se evaluó la productividad en planta piloto de la cepa, utilizando como semilla el micelio desarrollado sobre los medios preparados con las mezclas de paja y trigo. La velocidad de crecimiento radial (agar con mezclas de extracto) y longitudinal (mezclas de P y T) fue mayor en el medio M3. Estos resultados sugieren la posibilidad de estudiar la velocidad de desarrollo micelial de cepas sobre agar para predecir su comportamiento sobre sustratos naturales. En general, la actividad enzimática y contenido de proteína intracelular soluble observadas, fueron mayores en los medios preparados con P y T, posiblemente por tratarse del medio natural de desarrollo del hongo; sin embargo, la tendencia de actividad fue similar entre ambos sistemas experimentales. La productividad no mostró diferencias significativas entre los medios M4, M2, M3 y M5, mientras que el M1 presentó la más baja. Estos estudios muestran la posibilidad de reducir tiempos y costos en la elaboración de semilla, sin afectar la productividad industrial.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción y ciclo biológico del género <i>Pleurotus</i>	2
1.2. Importancia nutricional, económica y ecológica del género <i>Pleurotus</i>	5
1.3. Producción de hongos comestibles.....	7
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Pleurotus ostreatus</i> sobre medios de cultivo con agar y sobre sustratos naturales	10
2.2. Producción del cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i> en sustratos lignocelulósicos.....	12
2.2.1. Desarrollo del inóculo.....	15
2.2.2. Siembra, incubación y producción del cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i>	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. General.....	22
5.2. Particulares	22
6. METODOLOGÍA	23
6.1. Microorganismo	23
6.2. Medios de cultivo.....	23
6.2.1. Agar con mezclas de extractos de grano y de paja de trigo en caja Petri.....	23
6.2.2. Frascos con mezclas de grano y de paja de trigo.....	23
6.3. Determinación de la actividad enzimática intracelular.....	24
6.3.1. Obtención del extracto enzimático	24
6.3.2. Determinación de lacasas.....	24
6.3.3. Determinación de proteasas	24
6.3.4. Determinación de β -1,3-Glucanasas.....	25
6.4. Determinación de humedad del micelio.....	25
6.5. Determinación del contenido de proteína intracelular	25
6.6. Producción de <i>Pleurotus ostreatus</i> en planta piloto	26
6.8. Análisis estadístico.....	26
7. RESULTADOS	27
7.1. Velocidad de crecimiento radial	27
7.2. Velocidad de crecimiento longitudinal.....	27
7.3. Actividad intracelular de lacasas.....	28
7.4. Actividad intracelular de proteasas.....	29

7.5. Actividad intracelular de β -1,3-glucanasas.....	30
7.6. Contenido de humedad	31
7.7. Contenido intracelular de proteína soluble	32
7.8. Producción en planta piloto	33
8. DISCUSION.....	35
9. CONCLUSIONES.....	39
11. REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valor nutricional y energético de algunos alimentos, por cien gramos de porción comestible.....	6
Tabla 2. Composición química proximal de algunos sustratos empleados para el cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	13
Tabla 3. Parámetros de producción de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> , empleando semilla elaborada con diferentes cantidades de paja y trigo.....	34
Tabla 4. Contenido de humedad, de proteína y actividad enzimática intracelular, así como velocidad de crecimiento radial del micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado sobre medios con diferentes proporciones de extractos de paja y de trigo.....	34
Tabla 5. Contenido de humedad, de proteína y actividad enzimática intracelular, así como velocidad de crecimiento radial del micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado sobre medios con diferentes proporciones de de paja y de trigo.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida del género *Pleurotus* (Guinberteau 1990). 4
- Figura 2. Esquema general del cultivo de un hongo comestible, en especial de las especies de *Pleurotus*. 20
- Figura 3. Velocidad de crecimiento radial de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre diferentes medios de cultivo preparados con extractos de paja y grano de trigo en caja Petri. 27
- Figura 4. Velocidad de crecimiento longitudinal de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre medios de cultivo preparados con mezclas de paja y grano de trigo. 28
- Figura 5. Actividad intracelular de lacasas del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías), y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas). 29
- Figura 6. Actividad intracelular de proteasas del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías), y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas). 30
- Figura 7. Actividad intracelular de β -1,3-glucanasas del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías), y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas). 31
- Figura 8. Contenido de humedad del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías,) y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas). 32
- Figura 9. Contenido intracelular de proteína soluble del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías), y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas). 33

El impacto ecológico del cultivo de *Pleurotus ostreatus* se relaciona con su capacidad para degradar compuestos lignocelulósicos presentes en los residuos agrícolas, de los cuales se emplean más de 28,000 toneladas para la producción de estos organismos, reciclándose así estos compuestos en la naturaleza (Martínez-Carrera y cols. 1993).

A pesar de lo anterior, se han desarrollado pocos estudios en los que se investiguen los procesos bioquímicos que ocurren durante la fisiología del grupo de los basidiomicetos y la relación de estos con la productividad (Sánchez y Viniegra-González 1996, Sánchez y Moore 1999).

1.1. Descripción y ciclo biológico del género *Pleurotus*

Las especies de *Pleurotus* pertenecen a la familia de los basidiomicetos y son generalmente de color blanco, amarillento o rosado a veces grisáceo o color oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o de ostra. En relación con el estípite puede carecer de éste o puede ser lateral o excéntrico y puede ser corto, mediano o largo. Sus hifas presentan numerosas asas de anastomosis. Las laminillas son longitudinalmente decadentes sobre la base del estípite, con frecuencia anastomosadas transversalmente al nivel de la inserción del pie. Las esporas son lisas de color blanco, crema o lila pálido y presentan una forma cilíndrica (raramente elipsoides). El género es cosmopolita, está distribuido en Europa, Asia, África, Australia y Latinoamérica (Guinberteau 1990). Es un hongo saprófito, crece sobre troncos, ramas o árboles muertos y algunas veces se encuentra en la tierra sobre raíces podridas. La temperatura óptima de desarrollo de las especies de este género varía. *P. ostreatus* se desarrolla en climas templados en una temperatura de alrededor de 25°C, mientras que *P. pulmonarius* se desarrolla en climas semi-tropicales a una temperatura de 15-28°C.

La fase vegetativa es filamentosa porque está constituida por un conjunto de filamentos (hifas) denominado micelio (Herrera y Ulloa 1998). El crecimiento de éste se realiza sólo en las puntas. El micelio es un sistema de biomasa ramificada que se origina de la germinación de esporas o a partir de fragmentos de hifas. Su crecimiento se atribuye a un fenómeno complejo en el que participan vesículas, estas son agregados de enzimas hidrolíticas y sintéticas que degradan y restauran fragmentos de la pared celular. Las vesículas se producen a lo largo del segmento subapical y se transportan por medio de un mecanismo hasta llegar al centro distribuidor de vesículas conocido como Spitzenkörper. Desde ahí son distribuidas en forma radial y aleatoria hacia la pared apical dando lugar al crecimiento de las hifas (Bartnicki-García y cols. 1989).

El crecimiento de la hifa permite la formación de sitios adicionales para la síntesis de la pared en la región subapical, originando ramificaciones laterales las que a su vez sintetizan una nueva pared. La formación de las ramificaciones requiere de la producción de un nuevo ápice de la célula original existente (Deshpande 1992). El micelio tiene por función adquirir y distribuir los nutrimentos, así como el crecimiento y la formación de la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Klein 1996).

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales: 1) el homotalismo, los que pertenecen a este grupo son autocompatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio y 2) el heterotalismo en el que son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro del segundo modelo. En éste, las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) (A) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia) (B), formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de fíbulas (C), la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminillas del

cuerpo fructífero (D), posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas), que son expulsadas hacia el ambiente (E) (Figura 1).

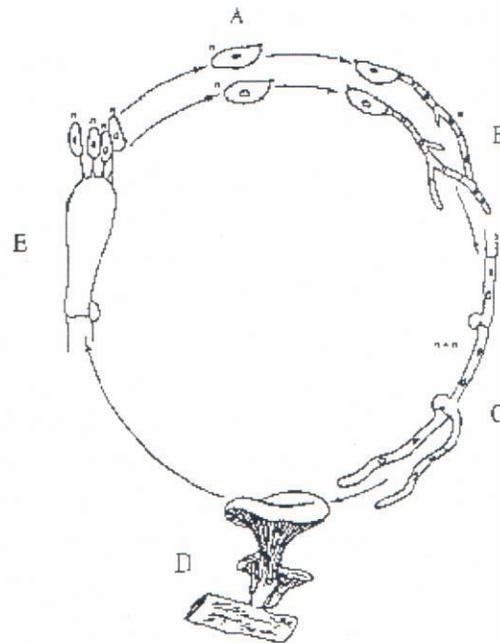


Figura 1. Ciclo de vida del género *Pleurotus* (Guinberteau 1990).

El patrón de sexualidad de los hongos, después de la cariogamia puede ser homotálico (primario o secundario) y heterotálico (unifactorial y bifactorial). El primero corresponde a la conjugación de dos micelios del mismo individuo; si es homotalismo primario, las esporas son uninucleadas y compatibles entre sí. En el homotalismo secundario las esporas formadas poseen dos núcleos cada una, que son compatibles entre sí y pueden formar un micelio secundario.

El heterotalismo es la formación o conjugación del micelio secundario a través de dos individuos. El heterotalismo unifactorial (dipolar o dipolaridad) tiene como producto final cuatro esporas uninucleadas, con un solo carácter genético cada una. En el heterotalismo bifactorial las cuatro esporas uninucleadas formadas poseen un juego de caracteres genéticos A y B, que al fusionarse por la plasmogamia, los micelios producidos forman núcleos tetrafactoriales o recombinantes de estos factores, es decir, núcleos ABAB; a este patrón de sexualidad se le llama también tetrapolar (Guzmán y col, 1993).

1.2. Importancia nutricional, económica y ecológica del género *Pleurotus*

Los hongos comestibles más cultivados en el mundo son *Agaricus bisporus* (champiñón), *Lentinula edodes* (shiitake) y *Pleurotus spp* (setas) (Ting y Chang 2002). El género *Pleurotus* es importante en la alimentación debido a sus características organolépticas y nutricionales (Martínez-Carrera 2000). La composición química del cuerpo fructífero de *P. ostreatus*, expresada en g de peso seco, es de 24.64 de proteína, 1.10 de lípidos, 7.66 de minerales, 32.14 de fibra y 26.33 de carbohidratos (Bautista y Alanis 1998). El valor energético total de *P. ostreatus* se encuentra entre los 250 y 350 cal/kg de hongo fresco. En términos de valor nutricional se ha reportado que 400 g de hongo fresco son equivalentes a 100 g de carne (Tabla 1) (Laborde 1995).

Tabla 1. Valor nutricional y energético de algunos alimentos, por cien gramos de porción comestible

Componente	Hongo fresco %	Carne magra de res %	Pollo %
Humedad	89.6	75	65.9
Fibra	2.5 (24.03)*	0	0
Carbohidratos	4.4 (42.3)*	0	0
Proteína total	3.2 (30.76)*	24	18.8
Grasa	0.3 (2.88)*	1.0	15.1
Energía Kcal	27	147	215
**Calcio (mg)	3.14	8.3	11

Instituto Nacional de la Nutrición (1992)

* Datos en paréntesis en base seca

**Tropical Mushroom Cultivation, T. H. Quimio, 2002

En México la producción comercial anual de hongos se estima en alrededor de 73 millones de dólares con una producción de 28,895 toneladas de producto fresco y la creación de 15 mil empleos directos e indirectos (Martínez-Carrera 2000).

La importancia ecológica de este género radica en que para su producción se utilizan y reciclan más de 280,000 toneladas de subproductos agroindustriales, acelerando así su biodegradación y reciclaje en la naturaleza (Martínez-Carrera 2000). La habilidad del crecimiento del micelio de *Pleurotus* sobre materiales lignocelulósicos se ha atribuido a la secreción de enzimas sacarificantes (celulolítica y hemicelulolítica), oxidativas y proteolíticas (Rajarathnam y Bano 1989).

El proceso de biodegradación que sufren los tejidos vegetales se debe a la acción combinada de varias clases de microorganismos y de hongos del grupo Basidimicetos, clasificados en dos categorías: hongos de pudrición blanca y hongos de pudrición oscura, así como de otros hongos clasificados como de pudrición blanca. Estas denominaciones reflejan los cambios físicos causados en la madera

por la acción de estos organismos. Los hongos de pudrición blanda atacan parcialmente la lignina y carbohidratos de fácil degradación. Los hongos de pudrición oscura causan escasos cambios menores en la estructura de la lignina y atacan completamente a la celulosa; pero los hongos de pudrición blanca, a los cuales pertenece *Pleurotus*, son capaces de degradar completamente la lignina dejando visible la celulosa, que es blanca (Jennings 1996, Morales y cols. 1991). Algunas cepas de *Pleurotus* muestran mayor afinidad para degradar la lignina que la celulosa (Ponce y Muñiz 1999). La capacidad de estos hongos para degradar sustratos lignocelulósicos se debe a la producción de fenoloxidasas y otras enzimas extracelulares, que hidroxilan los anillos aromáticos y pueden causar una ruptura oxidativa de éstos. Otras reacciones como la formación de radicales libres que incluyen la ruptura de los enlaces entre el anillo aromático y la cadena lateral del fenil propano, también son importantes (Leonowicz y cols. 1999).

La degradación de lignina es principalmente por oxidación, no provee de una fuente primaria de carbono y energía para el desarrollo del hongo, pero es un paso necesario probablemente en la utilización de los polisacáridos de la pared celular de las plantas (Griffin 1994).

1.1. Producción de hongos comestibles

Se considera que existen en la naturaleza más de 2000 especies de hongos comestibles, sin embargo sólo alrededor de 25 especies se consumen. Actualmente los hongos cultivados en el mundo son: champiñón (*Agaricus bisporus*) con el 56% de la producción total; el hongo negro del bosque o shiitake (*Lentinus edodes*), 14%; hongo de la paja (*Volvariella volvacea*), 8%; hongo ostra (*Pleurotus* spp), 8%; hongo oreja de la madera (*Auricularia* spp) 6%; pata de terciopelo (*Flammulina velutipes*) y otras especies, 3% (Chang y Miles 1987). La producción mundial de los hongos cultivados en 1986 fue cercana a 2.2 millones de toneladas métricas en peso fresco

(Breene 1990). Durante los últimos años, el cultivo de *Pleurotus* spp. ha tomado mayor importancia (Rajaratham y Bano 1987), ocupando en 1986 el cuarto lugar en la producción mundial, estimada en 176 mil toneladas (Breene 1990).

Los países donde se cultiva en forma comercial el *Pleurotus* spp. son: Kenia, Canadá, Australia, China, Alemania, Hungría, Italia, Francia, Noruega, India, Indonesia, Japón, Malasia, México, Pakistán, Filipinas, Singapur, Taiwan, Tailandia y Estados Unidos (Rajarathnam y Bano 1987).

Los hongos cultivados en México son el champiñón (*Agaricus* spp) y la "seta" (*Pleurotus* spp), este último crece en forma natural en diversos lugares del país, principalmente en los estados de clima semitropical o tropical, en donde se le conoce con diversos nombres; tales como: "oreja de cazahuate", "hongo de maguey" y "hongo ostra". El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en México representa alternativas ecológicas, nutricionales y económicas. Por otra parte, el problema de la desertificación en el país es alarmante pues si se considera que más de 60% de las tierras emergidas son áridas o semiáridas y a estas se suman anualmente alrededor de 200,000 hectáreas debido a la tala para abrir nuevas áreas para el cultivo de diferentes productos agrícolas, principalmente de maíz, frijol, café, arroz, trigo y la caña de azúcar, entre otros, o para la producción de pastos, de los que se alimenta una parte importante del ganado bovino que se produce en México. Estos alimentos son básicos para cubrir las necesidades alimenticias del pueblo mexicano, como fuentes de carbohidratos y proteínas; sin embargo, en la actualidad existe una carencia de tales productos, lo que hace necesario el uso eficiente de todas las posibles fuentes de alimento.

Los esquilmos de estos cultivos agrícolas pueden ser fuente de proteína de buena calidad en forma indirecta, si se emplean como sustratos en el cultivo de hongos comestibles, así como la aplicación al suelo de los residuos orgánicos después de cultivar los hongos para fertilizar el suelo. Esto representa algunas de las opciones

para mejorar el uso del suelo mexicano y con ello contribuir a la solución de los problemas de la alimentación y la desertificación del país.

En estudios realizados por Galicia (1994), se determinó que el *Pleurotus* contiene los nueve aminoácidos esenciales y sus proteínas son de buena calidad, aunque varían según la cepa usada; por tanto, se puede llevar a cabo investigaciones que permitan obtener cepas con alto rendimiento, y un elevado nivel nutricional.

El cultivo del *Pleurotus* spp. puede extenderse a diferentes regiones del país como una actividad económica, ya que cuenta con factores que favorecen su cultivo; entre los más importantes se encuentran: el clima, la materia prima disponible e infraestructura (servicios, carreteras, etc.) y un amplio mercado, tanto nacional como internacional, principalmente en E. U. y Canadá (Martínez y cols., 1991).

La demanda nacional supera la oferta. Los estados con potencial para el desarrollo de una industria de *Pleurotus ostreatus* son: Jalisco, México, Chiapas, Guanajuato, Michoacán, Veracruz, Puebla, Oaxaca y Tlaxcala ya que disponen de la materia prima y un clima adecuado. Los principales esquilmos que se producen en estos estados son: maíz, frijol, sorgo, trigo, pulpa de café, bagazo de caña de azúcar, algodón, arroz, ajonjolí, cártamo, cebada, bagazo de henequén y residuos del maguey tequilero.

Para que el cultivo de *Pleurotus ostreatus* tenga mayor probabilidad de éxito es importante llevar a cabo el estudio de factibilidad, según el lugar donde se desea establecer, ya que las condiciones climáticas y servicios son factores que pueden aumentar o disminuir los costos de inversión y de producción.

La producción de *Pleurotus* spp. en México puede tener resultados a corto plazo y desarrollarse como una de las actividades agrícolas más importantes si se estructuran mecanismos a nivel nacional que favorezcan su establecimiento. Entre los más importantes se encuentran:

- a) Establecimiento de programas a nivel nacional para incrementar el número de cultivadores de hongos.
- b) Estrategias de mercadotecnia para el producto y sus beneficios sean conocidos por la población mexicana.
- c) Organización de asociaciones de cultivadores de hongos.
- d) Estrecha vinculación entre los cultivadores de hongos y las instituciones académicas dedicadas a la investigación sobre el cultivo de hongos comestibles.
- e) Creación de centros de investigación exclusivos para el estudio de los problemas relacionados con el cultivo de hongos comestibles y el desarrollo de tecnologías que permitan incrementar la productividad y reducir los costos de producción para hacer más competitivo el producto con la consecuente formación de recursos humanos.
- f) Apoyo financiero por las diversas instituciones públicas o privadas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Desarrollo *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* sobre medios de cultivo con agar y sobre sustratos naturales

Las especies de género *Pleurotus* pertenecen a la familia de los basidiomicetos, estos organismos presentan gran capacidad para crecer en un amplio rango de temperaturas, así como para colonizar una gran variedad de desechos ligninocelulósicos naturales (Poppe 2000). Estos organismos producen una enzima lacasa (EC 1.14.18.1), la cual es una fenol oxidasa extracelular que induce una degradación oxidativa de la lignina y cataliza la polimerización de pequeñas moléculas fenólicas provenientes de esta degradación. El desarrollo de estas

especies en los residuos agrícolas permite la producción de cuerpos fructíferos comestibles.

En basidiomicetos, los cambios que ocurren durante la etapa de transición de la fase vegetativa a la formación del primordio o cuerpo fructífero son poco conocidos. Se ha reportado que los primordios se forman por el incremento en la masa micelial, mismos que crecen por la formación de hifas dicarióticas, las que se diferencian por la expansión del píleo y la elongación del estípite (Moore 1998). En *Coprinus cinereus* los primordios han sido descritos como una masa de hifas entrelazadas (Niederpruem 1978). Se ha sugerido que las hifas que se encuentran en la superficie del micelio podrían interactuar para formar centros de crecimiento rápido y control de las ramificaciones para crear los agregados hifales (Klein 1996). Se ha reportado que el micelio vegetativo continúa creciendo para el mantenimiento de los cuerpos fructíferos en desarrollo (Griffin 1994). La formación y desarrollo del cuerpo fructífero es controlada, entre otras causas, por mecanismos físicos y químicos. La temperatura es importante tanto en el desarrollo del micelio como en la fructificación, además la humedad es determinante en este proceso. En *Pleurotus ostreatus* se ha reportado que un intervalo de temperatura de 15-28°C, es necesaria para el desarrollo micelial y entre 10-25°C para la fructificación (Laborde 1995). El pH óptimo para cepas de este género es de 6-7 (Chang 1991). Para que se lleve a cabo una adecuada fructificación se requiere de la presencia de luz. Además, las altas concentraciones de CO₂ retardan la formación de cuerpos fructíferos. Tripathi y Yadav (1992) reportaron que algunos de los factores que influyen en la degradación por *Pleurotus ostreatus* de los sustratos agrícolas pueden ser las condiciones de cultivo y la estructura física y química del sustrato.

Sánchez (2000) encontró que las hifas de los cuerpos fructíferos desarrollados sobre paja de trigo presentaron una mayor cantidad de material citoplásmico que las hifas desarrolladas sobre agar extracto de papa. Por otro lado, se ha reportado que en una colonia de *P. pulmonarius* desarrollada sobre agar, las hifas de la zona central de

una colonia (o hifas maduras) presentaron menor contenido de material citoplásmico y una pared celular más gruesa que las hifas de la periferia de la colonia (o hifas jóvenes) (Sánchez y cols. 2004). Se ha sugerido que las hifas maduras son las responsables de la fructificación, mientras que las hifas jóvenes son las células metabólicamente activas responsables de la invasión micelial (Sánchez 1998).

2.2. Producción del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* en sustratos lignocelulósicos

Pleurotus ostreatus es un hongo comestible capaz de degradar prácticamente cualquier residuo agrícola o agroindustrial rico en complejos lignocelulósicos, que tienen poco o ningún valor como alimento o forraje en su forma original. Empleando estos residuos y mediante un proceso biotecnológico de fermentación en medio sólido, es posible obtener los cuerpos fructíferos de estos hongos (Fasidi y cols. 1996).

Los residuos agrícolas que más se emplean para la producción son: la paja de trigo, de cebada, y el rastrojo de maíz; todos ellos tienen altos contenidos de lignina, celulosa y hemicelulosa. Las composiciones porcentuales de estos sustratos se muestran en la Tabla 2. Se observa que los contenidos de proteína son mínimos, mientras que los valores más elevados corresponden a la fibra cruda.

Tabla 2. Composición química proximal de algunos sustratos empleados para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

Componente	Paja de trigo	Paja de cebada	Rastrojo de maíz
	g/100g		
Proteína cruda	3.9	7.3	2.9
Grasa cruda	1.5	2.0	0.8
Fibra cruda	36.9	25.4	36.9
Extracto libre de nitrógeno	41.9	49.3	45.3
Cenizas	8.3	6.8	1.9

(Flores 1989).

También se han empleado con éxito pajas de arroz, avena, centeno, aserrín de varias clases de madera, desperdicios de la industria papelera y pulpa de café (Poppe 2000).

El crecimiento de *Pleurotus ostreatus* está supeditado a la acción de factores como: temperatura, humedad ambiental, humedad del sustrato, pH, concentraciones de bicóxido de carbono y oxígeno, y de la luz. El micelio se desarrolla bien en un amplio rango de temperaturas, desde 10°C hasta los 40°C; sin embargo, la temperatura promedio oscila alrededor de los 25°C en la mayoría de las especies. La temperatura de fructificación varía con la especie. El mantenimiento de una temperatura y humedad adecuadas inciden directamente sobre el rendimiento y la eficiencia biológica (Houdeau 1991).

Rajaratnam y Bano (1989) reportaron los efectos que ocurren en el sustrato después del cultivo de *P. ostreatus*:

- Disminución de la presencia de compuestos solubles del sustrato. Éste es un criterio de evaluación del grado de descomposición, que envuelve niveles de

liberación de sustancias solubles en agua o liberación de azúcares. Por lo general se ha notado un incremento en el nivel de las sustancias solubles en agua a partir de los 20 días de haber sembrado el hongo y un decremento sustancial a partir de los 120 días.

- Aporte de biomasa. Durante la producción del cuerpo fructífero existe una bioconversión del material degradado del sustrato en biomasa.
- Presencia de hexosamina. Los valores de este compuesto descienden a partir de los 70 días de incubación, lo que indica la formación de los cuerpos fructíferos.
- Calor de combustión. Este parámetro decrece ligeramente durante la invasión micelial, lo que se debe al metabolismo del hongo, puesto que la lignina, que es el compuesto inicialmente degradado presenta mayor nivel de calor de combustión (5200 cal/g) que la celulosa (4030 cal/g).
- pH. En general, este parámetro desciende durante la degradación del sustrato por *Pleurotus* de 6.5-7.0 a 5.1-4.2. La secreción de ácido oxálico es una de las principales razones del descenso del pH.
- Fenoles y aminoácidos. El contenido de fenoles aumenta al inicio de la inoculación del hongo para disminuir posteriormente durante el proceso de incubación. En los aminoácidos se observan incrementos durante el crecimiento del hongo, lo que puede ser probablemente consecuencia de la actividad proteolítica.
- Nitrógeno. Durante el desarrollo del hongo la cantidad de nitrógeno en el sustrato se incrementa relativamente, lo que se debe a la pérdida de CO₂.
- Celulosa, hemicelulosa y lignina. Debido a la habilidad ligninolítica de *Pleurotus*, el principal cambio en el sustrato se presenta en la degradación de estos compuestos.

3.2.1. Desarrollo del inóculo

Para el crecimiento del micelio, es importante considerar las fuentes de nutrimentos como, fuentes de carbono y nitrógeno, vitaminas y sales minerales, y la capacidad de aprovechamiento de la cepa, pues de ellos dependen las características del cuerpo fructífero. La cepa se describe como una masa de micelio desarrollada sobre un medio de cultivo adecuado contenido en una caja Petri, en un tubo de ensayo o en frascos de vidrio. Una vez desarrollado el micelio, bajo las condiciones de temperatura de incubación durante siete a doce días o hasta invasión total del medio, se deberá mantener en refrigeración para evitar su deterioro e inhibir su envejecimiento (Smith y Onions 1998).

Para el desarrollo del micelio se emplean medios de cultivo como agar extracto de malta y agar dextrosa papa. Cuando el micelio se ha obtenido en la caja Petri, se inocula sobre granos de cereales. La semilla tradicional se elabora empleando granos de cereales tales como: trigo, centeno, mijo, arroz y sorgo.

Los primeros procedimientos para obtener inóculos consistieron en desenterrar micelio directamente del sitio en donde crecían los hongos en las praderas, pero estos métodos para perpetuar el micelio silvestre eran inseguros y poco confiables.

Los primeros inóculos que se manufacturaron datan de principios del siglo 20 y consistían en combinaciones de mezclas sin esterilizar de estiércol de caballo y de vaca, prensados en forma de ladrillo, los cuales contenían el micelio silvestre. Frecuentemente, éstos ladrillos contenían patógenos y mohos dañinos. Los ladrillos se elaboraban para el cultivo de *Agaricus sp.*

En 1915 se produjeron inóculos de cultivo puro, sobre composta esterilizada de estiércol de caballo; sin embargo, éste avance no eliminó la dificultad de obtener inóculos productivos y confiables, libres de insectos y de parásitos pero permitió almacenar los inóculos para utilizarlos de manera seriada o bien, cuando las

condiciones ambientales fueran adecuadas para el cultivo. Las compostas se inoculaban con micelio de *Agaricus sp.*

En 1930 la Universidad del estado de Pennsylvania contrató al Dr. James W. Sinden para trabajar en el área de hongos. Realizó múltiples experimentos para encontrar un medio en el que el micelio pudiera crecer mas vigorosamente y proporcionara un producto mas uniforme. Este medio fue el grano de trigo colocado en frascos con una pequeña cantidad de agua y sometido a esterilización. Al introducir el micelio, se observó un crecimiento mucho mas vigoroso, en menor tiempo y de una manera jamás vista (Royse y Schisler, 1980).

En 1962 Stoller perfeccionó la producción de inóculos, empleando cepas seleccionadas y midiendo los niveles de hidratación del grano (Royse y Schisler, 1980). Actualmente, la producción de inóculo (semilla) se realiza casi exclusivamente con grano de trigo y algunos otros cereales (Guzmán 1993). El cereal seleccionado se somete a un proceso de lavado, cocimiento, esterilización y enfriamiento, para su posterior inoculación en condiciones estériles de la cepa deseada hasta invasión total. Ya invadido completamente, el grano será empleado como semilla para su siembra en el sustrato disponible para la producción del hongo (Guzmán 1993).

Existen diversas investigaciones en las que se ha estudiado el empleo de varios sustratos así como la mezcla de ellos en la producción de hongos (Poppe 2000). De igual manera hay estudios que se han realizado para desarrollar semilla de alta calidad y producida a bajo costo. Es decir, empleando rastrojos de cereales en lugar de los granos de éstos, o bien mezcla de diferentes sustratos, con el objeto de abaratar el costo de producción.

Hasta ahora la semilla de alta calidad se produce en las grandes industrias a un precio todavía elevado para las pequeñas plantas productoras de hongos. Por lo que el desarrollo de semilla empleando sustratos accesibles a bajo costo sería de crucial

importancia para el cultivo de estos organismos. En este sentido, se han realizado estudios para la elaboración de la semilla, en los cuales se mezclaron diversos sustratos y se evaluó su influencia en el cultivo. Desafortunadamente, en tales investigaciones no se han obtenido resultados objetivos en cuanto a la productividad del cultivo empleando la semilla elaborada. Mai y cols. (1997) reportaron que para el cultivo de *Dictyophora* una semilla de alta calidad es aquella que está preparada con una mezcla de 68% aserrín, 10% de hojas de bambú, 18% de salvado, 3% desechos de soya, 2% de azúcar y 1% carbonato de calcio.

De igual manera, se ha reportado que para el cultivo de *Coprinus comatus*, una buena semilla se prepara empleando 75% de semilla de algodón, 1% de azúcar, 2% cal, y alrededor de 65% de agua (Luo 1997, Chen 2000). Aunque en ambos casos no se evaluó la productividad a nivel de cultivo. Por otro lado, Morais y cols. (2000) reportaron que para el cultivo de *Lentinus edodes* una semilla de alta calidad es aquella desarrollada sobre grano de avena adicionado con 0.5% de carbonato de calcio y 2% sulfato de calcio, misma que al ser utilizada para el cultivo de este hongo sobre aserrín y harina de soya, produjo una eficiencia biológica de 42.3 a 60%, lo que también dependió de la cepa. Igualmente, se ha empleado como semilla de hongos el sustrato post-cultivo de éstos, pero como es de esperarse la producción es baja y tampoco se ha determinado su productividad en el ámbito de cultivo. Para el cultivo de *Volvariella volvacea* también se han empleado mezclas de sustratos lignocelulósicos para preparar el inóculo, principalmente de los existentes en la región donde se cultivará el hongo (Quimio 2002). Matiru y Quimio (1992) reportaron que mezclas de aserrín con al menos 10-20% de hojuelas de arroz (o trigo), harina de maíz o harina de hojas de leguminosas, produjeron un buen número de primordios de *V. volvacea*.

Para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* se ha empleado semilla preparada con 80% de aserrín de eucalipto (*Eucalyptus* sp), 20% de grano de arroz y humedad de 60%. Cuando se cultivó este hongo sobre cáscara de café, adicionada entre 10-15% de

esta semilla se obtuvo una eficiencia biológica de 97%, mientras que sobre desechos de café, empleando el mismo porcentaje de semilla se obtuvo una eficiencia biológica de 90.4% (Yang 1986, Leifa y cols. 2004).

Se han cultivado cepas de *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* y *P. colombinus* sobre aserrín o paja de arroz, empleando semilla elaborada a base de sorgo, grano de paja o trigo, después de haber sido humidificados por 24 h. Sin embargo, sólo se observó a simple vista que el sustrato se había invadido de manera similar y abundante, además, que *P. sajor-caju* y *P. colombinus* presentaron la mayor cantidad de hongos producidos, pero no se determinaron la eficiencia, ni la influencia de la semilla en la productividad del cultivo (Gibriel y cols. 1996).

Adicionalmente, Muthukrishnan y cols. (2000) sugirieron el uso de los desechos de producción de la larva de la palomilla de arroz *Corcyra cephalonica* mezclada con el grano de sorgo para la producción de la semilla del hongo comestible *Pleurotus sajor-caju*. En la India, dicha larva se produce en grandes cantidades sobre grano de mijo y es empleada como pesticida en el arroz y algunos vegetales. Estos autores encontraron que combinaciones de sorgo y desechos de la producción de la larva en 16.7% + 83.3% y 33.3% + 66.7%, incrementaron el crecimiento micelial y la colonización del sustrato, así como la producción. Sin embargo el hongo no creció cuando el sustrato de cultivo fue preparado con 100% de desechos de la producción de la larva. Por otro lado, también encontraron que la producción de hongos incrementó cuando el sustrato de producción se preparó con mezclas de desechos de la producción de arroz y desechos de la producción de la larva, en concentraciones de 75% + 25% y de 50% + 50%, respectivamente.

2.2.2. Siembra, incubación y producción del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*

El proceso general de producción de los hongos se ilustra en la Figura 2. La preparación del sustrato donde se inoculará el hongo, el tiempo de incubación y las condiciones requeridas en la fructificación, dependen de la especie a ser cultivada. En el caso de especies del género *Pleurotus*, el sustrato para crecimiento, ya sea rastrojo de maíz, paja de cebada, trigo etc., se pasteuriza a 85 °C durante 1 h. La siembra se puede realizar en diferentes contenedores, por ejemplo: bolsas de plástico, charolas o estanterías de aluminio, mismas que se inoculan con micelio del hongo en una cantidad de 3 a 5% en relación al peso del sustrato húmedo. El inóculo se distribuye homogéneamente en el sustrato y la incubación se realiza a 25°C hasta completa invasión micelial del sustrato (aproximadamente 20 días) (Chang y Hayes 1978, Chang y Miles 1989, Guzmán 1993).

La rapidez en la invasión del sustrato también dependerá de la cepa y cantidad de semilla utilizada en la siembra del hongo. Una vez que el sustrato ha sido totalmente invadido por el micelio, las bolsas (charolas, estanterías de aluminio, etc.) son trasladadas a un cuarto de producción en el cual la inducción de la fructificación se realiza en un ambiente provisto con humedad, luz y una temperatura menor a la requerida durante la incubación. En condiciones de cultivo ideales el tiempo de incubación puede ser de solo 8 días, en cuyo caso la primera cosecha de hongos se puede realizar después de 2 semanas de haber realizado la siembra (Laborde 1995).

La industria productora de hongos se ha desarrollado de manera importante, lo que hace que cada día se empleen nuevos y mejores materiales y equipo en el proceso de producción de hongos (Sánchez 2004). La cepas que se utilizan son de suma importancia ya que los productores de estos hongos pueden padecer alergias a las esporas, por lo que se están realizando diversos estudios para desarrollar cepas

especies de *Pleurotus* (Laborde 1995, Mori y cols. 1998, Saikai y cols. 2002, Senti y cols. 2000, Sánchez 2004).

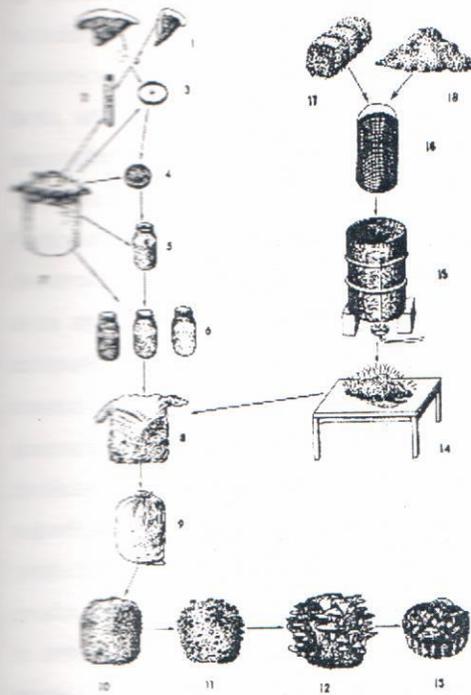


Figura 2. Esquema general del cultivo de un hongo comestible, en especial de las especies de *Pleurotus*.

1-3: obtención de la cepa a través de fructificaciones ya sea por medio de esporas o con un fragmento del micelio del hongo. 4-5: obtención del inóculo (frasco primario) con semillas seleccionadas. 6: obtención de frascos secundarios de inóculo. 7: olla de presión con la se indica que todos los utensilios empleados en el cultivo debe esterilizarse. 8: siembra del hongo en el sustrato seleccionado. 9: cerrado de la bolsa de plástico. 10: desarrollo de los primordios. 11: crecimiento de las fructificaciones. 12: fructificaciones listas para ser cosechadas. 13: cosecha. 14: enfriado del sustrato. 15: pasterización del sustrato. 16: canasta que se usa para la pasterización del sustrato. 17: paca de paja. 18: pulpa de café o bagazo de cualquier otro residuo agro-industrial (Guzmán 1993).

3. JUSTIFICACIÓN

La producción de *Pleurotus ostreatus* permite producir alimentos de alto valor nutricional a partir de residuos agrícolas considerados como desperdicios y contaminantes del medio ambiente. La producción de este hongo representa, por lo tanto, una opción industrial económica y ecológicamente viable. Con el objeto de desarrollar nuevas tecnologías y optimizar las ya existentes para hacer más eficiente la producción intensiva, es crucial conocer la fisiología de estos organismos. Particularmente, uno de los factores bioquímicos de mayor importancia en el desarrollo de estos hongos lo constituye la actividad enzimática que determina, entre otros aspectos, la capacidad para degradar y utilizar como fuente de carbono los compuestos lignocelulósicos presentes en los sustratos. Debido a que la semilla es el insumo más costoso en la producción de hongos comestibles, se han desarrollado diversos estudios para disminuir los costos de su producción. Sin embargo, algunas técnicas que se han desarrollado para producirla a un menor costo están supeditadas a infraestructura muy costosa y que sólo existe en las grandes industrias productoras de semilla, por lo que es necesario el desarrollo de técnicas de producción, empleando equipo menos sofisticado y sustratos más económicos. Por lo anterior, en esta investigación se estudió el efecto de la adición de diferentes cantidades de paja de trigo al sustrato comúnmente utilizado (grano de trigo) para la preparación de la semilla de *Pleurotus ostreatus*, así como su efecto sobre la actividad enzimática del inóculo y sobre su productividad en planta de producción.

4. HIPÓTESIS

La sustitución parcial de trigo por paja en la composición del sustrato para obtención de semilla de *Pleurotus ostreatus* reducirá tiempos y costos en su producción.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar la productividad en planta piloto del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* empleando semilla desarrollada sobre sustratos preparados con diferentes mezclas de grano y paja de trigo.

5.2. Particulares

Elaboración de semilla de *Pleurotus ostreatus* con distintas proporciones de paja y trigo para emplearse en la producción del hongo.

Determinar la productividad de *Pleurotus ostreatus* en planta piloto, empleando semilla preparada con diferentes mezclas de paja y trigo.

Caracterización parcial bioquímica y fisiológica del micelio de la semilla obtenida con diferentes mezclas de paja y trigo y del micelio obtenido con diferentes mezclas de extractos de paja y trigo para establecer la correlación entre ambos sistemas.

6. METODOLOGÍA

6.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 3526 de la colección Northern Regional Research Center (Illinois, U.S.A). La cepa stock se desarrolló sobre agar dextrosa-papa (ADP) a una temperatura de 25°C por 7 días y se mantuvo en refrigeración, resembrándose cada 30 días. El inóculo empleado en los estudios de laboratorio se desarrolló sobre ADP a 25°C por 7 días.

6.2. Medios de cultivo

6.2.1. Agar con mezclas de extractos de grano y de paja de trigo en caja Petri

Los extractos se obtuvieron por lixiviación de la paja o de los granos de trigo al 10% (w/w) en agua destilada a 85°C por una hora. El medio de cultivo se preparó con 15 g de agar bacteriológico por litro de mezcla de extractos filtrados. Se prepararon 5 medios de cultivo con diferentes mezclas de extractos (v/v): M1, 100% paja; M2, 75% paja + 25% trigo; M3, 50% paja + 50% trigo; M4, 25% paja + 75% trigo; y M5, 100 % trigo. Se colocaron 35 ml de cada medio en cajas Petri, en condiciones estériles se inocularon y se incubaron a 25 °C por 7 días. Se evaluó la velocidad de crecimiento radial (VR) (Sánchez y Viniegra 1996). Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

6.2.2. Frascos con mezclas de grano y de paja de trigo

En frascos de vidrio de 600 ml se colocaron 300 cm³ de las mezclas de paja y de grano de trigo, al igual que en el experimento anterior se prepararon 5 medios (M1, M2, M3, M4 y M5) de cultivo con los porcentajes de paja y grano de trigo (w/w) ya indicados (ver 6.2.1.). En condiciones estériles se inocularon empleando 4 inóculos/frasco de 9 mm de diámetro, éstos fueron colocados uniformemente en la

periferia del sustrato y se incubaron a 25°C hasta invasión micelial total. Se evaluó la velocidad de crecimiento longitudinal (VL). Estos medios de cultivo se utilizaron como semilla en la etapa de producción en planta piloto. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

6.3. Determinación de la actividad enzimática intracelular

6.3.1. Obtención del extracto enzimático

El extracto enzimático (EE) se obtuvo por lisis celular (empleando un macerador de tejidos Pirex) del micelio obtenido de cada medio de cultivo tanto en cajas Petri como en frascos, en un volumen de agua conocido. El macerado se centrifugó a 15 000 rpm por 10 min a una temperatura de 2°C, el sobrenadante se consideró como el EE.

6.3.2. Determinación de lacasas

Para determinar la actividad intracelular de lacasas se utilizó como sustrato 2,6-dimetoxifenol (SIGMA) 2mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5. La mezcla de reacción (475 µl de sustrato, 50 µl de EE) se incubó a 39°C por 15 min. La reacción se detuvo por la adición de 475 µl de dimetilsulfóxido (SIGMA). Se leyó la absorbancia a 468 nm. Una unidad de actividad (U) de lacasas se consideró como la cantidad de enzima que provoca incrementos de 1.0 unidad en la absorbancia por min de incubación (Ardon y cols. 1998).

6.3.3. Determinación de proteasas

La actividad intracelular de proteasas se determinó por la cuantificación de aminoácidos aromáticos liberados en la mezcla de reacción (450 µl caseína al 1% en buffer de fosfatos 0.1M y pH de 6.0 y 50 µl de EE), incubada a 35°C por 15 min. La reacción se detuvo por la adición de 750 µl de ácido tricloroacético (Baker) al 5%. La

mezcla se centrifugó a 15 000 rpm por 30 min a temperatura de refrigeración. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Una U de proteasas se consideró como la cantidad de enzima que libera aminoácidos aromáticos que provocan un cambio de 1.0 unidad en la absorbancia por min de incubación (Kunitz 1947).

6.3.4. Determinación de β -1,3-Glucanasas

La actividad intracelular de β -1,3-Glucanasas se cuantificó evaluando el incremento de los azúcares reductores liberados en la mezcla de reacción (500 μ l laminarina (SIGMA) al 0.7%, 450 μ l de buffer de acetatos 0.1M pH 5 y 50 μ l de EE) incubada a 37°C por 90 min (Sharma y Nakas 1987). La reacción se detuvo al adicionar 2 ml de DNS, la mezcla se calentó a temperatura de ebullición por 5 min y después de enfriarse, se leyó la absorbancia a 575 nm. Una unidad internacional (UI) de actividad de glucanasas, es la cantidad de enzima que libera 1 μ M de producto por min. Se preparó una curva de calibración con glucosa.

6.4. Determinación de humedad del micelio

La humedad se determinó por el método indirecto de secado en horno (AOAC 1990).

6.5. Determinación del contenido de proteína intracelular

Se determinó la cantidad de proteína en el EE por el método de Bradford (1976). A 100 μ l de EE diluidos en 700 μ l de agua se le agregaron 200 μ l del reactivo de Bradford (SIGMA). Se leyó la absorbancia de la mezcla a 595 nm. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA, SIGMA) como proteína estándar.

6.6. Producción de *Pleurotus ostreatus* en planta piloto

La siembra del hongo se realizó en bolsas de nylon alternando capas de semilla y de paja previamente pasteurizada a 85 °C por 90 minutos. Se utilizó cada frasco de semilla para inocular 5 Kg de paja húmeda. Las bolsas ligeramente compactadas se incubaron en ausencia total de luz, a los tres días de incubación se realizaron perforaciones sincronizadas a cada bolsa. Después de quince días de incubación, las bolsas se trasladaron al área de producción en presencia de luz y 90% de humedad, y se les realizaron más perforaciones donde se observó la formación de primordios para permitir la fructificación. Se registró el tiempo de aparición de los primordios y de los cuerpos fructíferos maduros. Finalmente se determinó el peso fresco de los hongos de dos cosechas en las cinco repeticiones por tratamiento.

6.7. Determinación de eficiencia biológica y productividad.

La eficiencia biológica es la cantidad (en kilogramos) de hongo fresco producido por cada kilogramo de sustrato seco. La humedad del sustrato se determinó por el método indirecto de secado en horno (AOAC, 1990). Por otra parte, la productividad se define como la cantidad (en gramos) de hongo fresco producido por cada kilogramo de sustrato seco por día, incluyendo el tiempo de incubación.

6.8. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, se utilizaron ANOVA y prueba de diferenciación de medias por el método de Duncan, mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System).

7. RESULTADOS

7.1. Velocidad de crecimiento radial

La mayor velocidad de crecimiento radial se observó (Figura 3) en M3 y no mostró diferencias significativas entre los medios M2 y M4; M1 y M5 mostraron la menor velocidad.

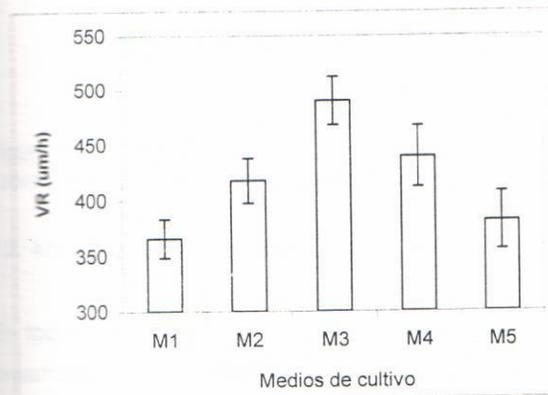


Figura 3. Velocidad de crecimiento radial de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre diferentes medios de cultivo preparados con extractos de paja y grano de trigo en caja Petri.

7.2. Velocidad de crecimiento longitudinal

La mayor velocidad de crecimiento longitudinal (VL) se observó en el M3, misma que fue aproximadamente dos veces mayor comparada con el resto de los medios de cultivo. El medio M4 presentó un valor ligeramente mayor que el M1, M2 y M5 (Figura 4).

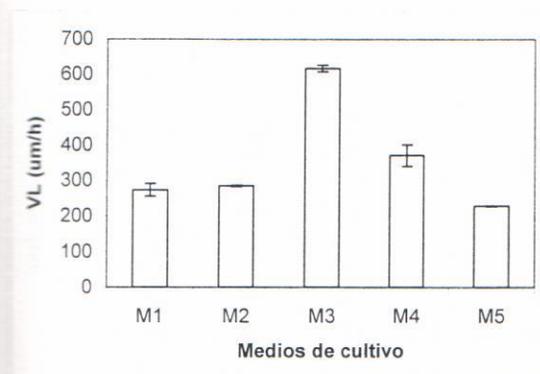


Figura 4. Velocidad de crecimiento longitudinal de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre medios de cultivo preparados con mezclas de paja y grano de trigo.

7.3. Actividad intracelular de lacasas

En todos los casos, la actividad intracelular de lacasas observada en el micelio desarrollado sobre las diferentes mezclas de paja y grano de trigo fue considerablemente mayor al compararse con la observada en el micelio desarrollado sobre extractos de paja y grano de trigo en caja Petri, en donde la actividad de lacasas en los medios M2, M3 y M4 fue de aproximadamente 10 U/g X, no mostrando diferencia significativa entre sí. El M1 presentó la menor y el M5 la mayor actividad intracelular de lacasas.

Por otra parte, la actividad de lacasas del micelio desarrollado sobre frascos en el M3 fue aproximadamente 80 veces mayor (803 U/g X) que la observada en el micelio desarrollado sobre el M3 en cajas Petri (9.96 U/g X). El M2 presentó aproximadamente 700 U/g X y el M1, 400 U/g X, mientras que el M4 y M5 presentaron sólo alrededor de 50 U/gX (Figura 5).

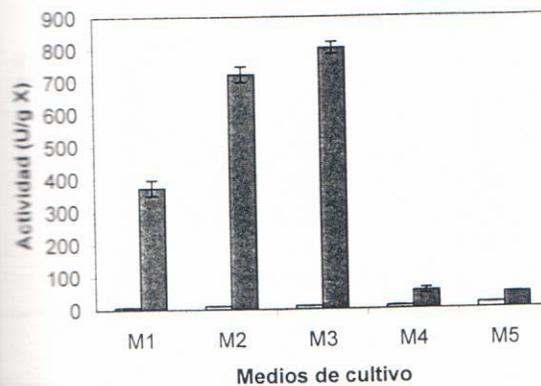


Figura 5. Actividad intracelular de lacasas del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías), y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas).

7.4. Actividad intracelular de proteasas

En general, el patrón de la actividad intracelular de proteasas fue similar entre los medios sobre agar y los medios en frascos. En los medios M1 y M5, la actividad de proteasas del micelio desarrollado sobre cajas Petri y frascos fue significativamente diferente. En cajas Petri y frascos la mayor actividad se presentó cuando el grano de trigo estuvo ausente y fue disminuyendo según aumentó la cantidad de grano de trigo, excepto cuando el micelio se desarrolló en el M5 en frasco, cabe mencionar que en el M3 la actividad de proteasas fue similar a la presentada en el M2 (Figura 8).

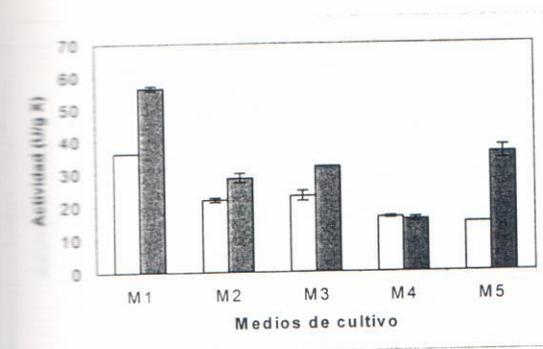


Figura 6. Actividad intracelular de proteasas del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías), y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas).

7.5. Actividad intracelular de β -1,3-glucanasas

La actividad de β -1,3-glucanasas se observó en el micelio desarrollado sobre todos los medios en caja Petri, mientras que en el micelio desarrollado sobre frascos sólo se detectó actividad en los medios M3, M4 y M5. Aún cuando se registraron diferencias significativas entre los valores de esta actividad, todas ellas fueron muy bajas, con valores de 3 a 9 U/g X (Figura 7).

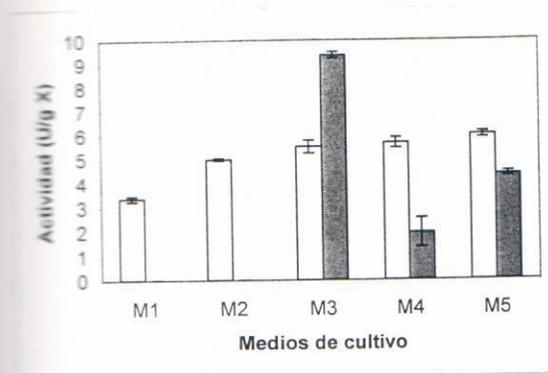


Figura 7. Actividad intracelular de β -1,3-glucanasas del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías), y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas).

7.5. Contenido de humedad

En la Figura 8 se observa que el contenido de humedad del micelio fue similar en los diferentes medios de cultivo, tanto en el micelio desarrollado sobre cajas Petri como en el micelio desarrollado sobre frascos. No hubo diferencias significativas entre los valores de humedad.

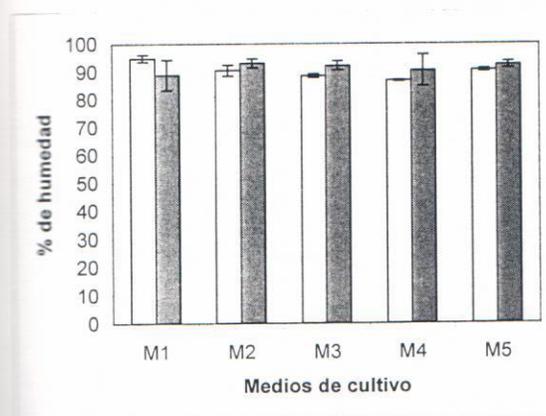


Figura 8. Contenido de humedad del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías,) y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas).

7.7. Contenido intracelular de proteína soluble

La cantidad de proteína soluble del micelio desarrollado sobre caja Petri y frascos presentó la misma tendencia, sin embargo el contenido de ésta fue mayor en el micelio desarrollado sobre frascos en todos los medios de cultivo. Se observó una relación inversa entre el contenido de proteína y el del grano de trigo, excepto en M5, en la que fue mayor a M4 pero inferior al resto de los medios (Figura 9).

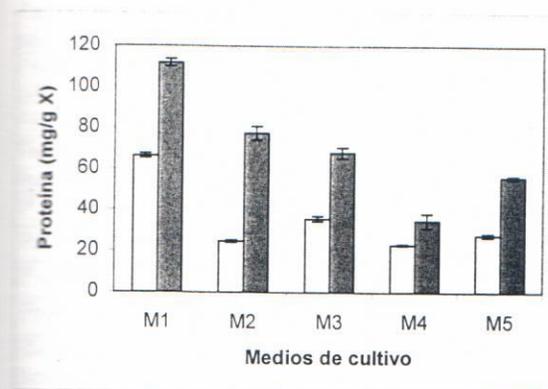


Figura 9. Contenido intracelular de proteína soluble del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre agar con extractos de paja y grano de trigo (barras vacías), y sobre mezclas de paja y grano de trigo (barras llenas).

7.8. Producción en planta piloto

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos durante la producción de cuerpos fructíferos en planta piloto empleando los diferentes inóculos. Se observó que la mayor eficiencia biológica se presentó cuando se utilizó como semilla M3 (50% paja de trigo + 50% trigo) y fue similar a la obtenida cuando se empleó como semilla M5 (100% grano de trigo, semilla tradicional). Cuando la semilla empleada en el cultivo fue M1, M2 y M4, la eficiencia biológica obtenida dependió de la cantidad de grano de trigo presente. Similar productividad se observó cuando los inóculos utilizados en el cultivo fueron M2, M3, M4 y M5. La menor productividad se obtuvo cuando la semilla utilizada en el cultivo fue M1.

Tabla 3. Parámetros de producción de la cepa de *Pleurotus ostreatus*, empleando semilla elaborada con diferentes cantidades de paja y trigo.

PARÁMETRO DE PRODUCCIÓN	CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA				
	M1	M2	M3	M4	M5
Tiempo de fructificación*	17.6 ± 0.54	14.6 ± 0.8	16.8 ± 0.83	15 ± 0.7	17.4 ± 0.89
1ª Cosecha*	24.6 ± 0.54	21.0 ± 1.8	24.4 ± 0.54	20.0 ± 0.0	23.8 ± 0.44
Producción (g)	975.84	993.86	1199.88	1117.5	1294.92
2ª Cosecha*	40.0 ± 1.2	33.4 ± 1.3	40.0 ± 1.4	35.4 ± 1.3	32.2 ± 1.4
Producción (g)	645.18	756.44	807.94	761.48	626.5
Eficiencia Biológica ¹	1.265 ^b	1.367 ^a	1.568 ^a	1.467 ^a	1.50 ^a
Productividad ²	31.68 ^b	41.01 ^a	39.23 ^a	41.39 ^a	37.5 ^a

*kg de hongo fresco/kg de paja seca.

²Gramos de hongo fresco/Kg sustrato seco/día.

• días.

En las tablas 4 y 5 se concentran los resultados bioquímicos y de crecimiento del hongo sobre los diferentes medios de cultivo

Tabla 4. Contenido de humedad, de proteína y actividad enzimática intracelular, así como velocidad de crecimiento radial del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre medios con diferentes proporciones de extractos de paja y de trigo.

Medio	Humedad (%)	Proteína (mg/g X)	Lacasas (AU/g X)	Proteasas (AU/g X)	Glucanasas (UI/g X)	VR (µm/h)
M1	94.9 (1.26) ^a	66.3 (1.04) ^c	36.1(0.44) ^d	36.1 (0.00) ^b	3.4 (0.11)	360.2 ^b
M2	90.5 (1.96) ^a	24.7 (0.62) ^f	21.5 (0.00) ^e	21.5 (0.69) ^e	5.0 (0.05)	423.5 ^a
M3	88.6 (0.65) ^a	35.6 (1.20) ^e	22.9 (0.47) ^e	22.9 (1.54) ^e	5.5 (0.27)	485.7 ^a
M4	86.8 (0.02) ^a	23.0 (0.33) ^g	16.4 (0.27) ^e	16.4 (0.32) ^f	5.7 (0.22)	438.8 ^a
M5	90.6 (0.47) ^a	27.6 (0.82) ^f	14.7 (0.3) ^e	14.7 (0.00) ^f	6.0 (0.13)	383.9 ^b

Las medias de la misma columna con la misma letra no son diferentes significativamente (p<0.001)
El número entre paréntesis corresponde a la desviación estándar de tres experimentos independientes

Tabla 5. Contenido de humedad, de proteína y actividad enzimática intracelular, así como velocidad de crecimiento radial del micelio de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre medios con diferentes proporciones de paja y de trigo.

Medio	Humedad (%)	Proteína (mg/g X)	Lacasas (AU/g X)	Proteasas (AU/g X)	Glucanasas (UI/g X)	VL ($\mu\text{m/h}$)
M1	88.8 (5.46) ^a	112 (1.8) ^a	373 (24) ^c	56.4 (0.8) ^a	0.00	250.6 ^c
M2	93.1 (1.59) ^a	77.3 (3.8) ^b	722 (24) ^b	28.5 (1.4) ^d	0.00	293.6 ^c
M3	92.2 (1.65) ^a	67.7 (2.6) ^c	803 (18) ^a	31.9 (0.0) ^c	9.37 (0.13)	599.7 ^a
M4	90.4 (5.61) ^a	34.5 (3.5) ^e	54 (9.0) ^d	15.6 (0.8) ^f	1.95 (0.59)	347.6 ^b
M5	92.5 (1.20) ^a	55.7 (0.8) ^d	47 (1.0) ^d	36.0 (2.1) ^b	4.34 (0.11)	228.5 ^c

Las medias de la misma columna con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0.001$)
El número entre paréntesis corresponde a la desviación estándar de tres experimentos independientes

8. DISCUSION

Los resultados obtenidos en cajas Petri y en frascos muestran que la mezcla de sustratos (paja y grano de trigo) promueve un metabolismo más activo en el hongo, ya que en los medios que tuvieron un sólo sustrato, la invasión micelial fue menor. También se observó que la invasión micelial se incrementó a medida que se equilibraba la proporción en cantidad de la paja y grano de trigo, por lo que se puede afirmar que la mezcla con una cantidad similar de ambos sustratos presenta mayor velocidad de crecimiento. Esto, debido al incremento metabólico y a las reservas nutricionales proporcionadas por la paja y grano de trigo, respectivamente. Además, se observó que la velocidad de invasión micelial fue mayor en los frascos que contenían 100% de paja de trigo comparados con los frascos que contenían 100% de grano de trigo, lo que confirma que la paja de trigo incrementa el nivel metabólico del hongo, debido a que es su sustrato natural, mientras que el trigo representa una fuente rica de carbono, que resulta en una velocidad de crecimiento mayor al emplear una mezcla con la misma proporción de ambos sustratos. En estudios previos se observó que las hifas de *Pleurotus pulmonarius* desarrolladas sobre paja de trigo, presentaron mayor cantidad de material citoplásmico (glicógeno) que las hifas de los hongos desarrolladas sobre un medio comercial como agar extracto de

papa (Sánchez 2000), lo cual es otro indicativo del nivel metabólico presentado por el hongo cuando crece sobre sustratos naturales.

En general, la actividad de β -1,3-glucanasas se observó en el micelio desarrollado sobre todos los medios. Estas enzimas podrían estar implicadas principalmente en procesos de diferenciación celular, por lo que la invasión micelial es mayor, en los medios que también presentaron una mayor actividad de estas enzimas. Lo que podría estar relacionado principalmente con la edad celular en la etapa de crecimiento y ramificación de las hifas (Ramot y cols. 2000, Téllez y cols. 2003, Sánchez y cols. 2004).

En cajas Petri, la actividad de lacasas en los medios M2, M3 y M4, fue de aproximadamente 10 U/g X, sin mostrar diferencia significativa entre sí. El M1 presentó la menor y el M5 la mayor actividad intracelular de lacasas, lo cual sugiere que en el medio con extracto de paja existe una excreción mayor de lacasas, posiblemente por los compuestos lixiviados de la paja; pero en el medio con extracto de grano de trigo, esos compuestos están en menor concentración, limitando así la excreción de las enzimas. Los resultados de actividad de lacasas sobre las mezclas de paja y grano de trigo sugieren que la paja, por ser muy parecida al sustrato natural del hongo, favorece la inducción de estas enzimas, aún cuando se esperaría que la gran mayoría fueran excretadas (análisis no realizados). Esto muestra que la actividad fue mayor en un medio que contiene la misma proporción de paja y de grano de trigo, mientras que la cantidad de enzimas se reduce drásticamente cuando no contiene paja, o sólo una cantidad mínima de ésta en el medio.

En general, el patrón de actividad de proteasas fue similar entre los medios sobre agar y los medios en frascos. En ambos casos la mayor actividad se presentó cuando el sustrato no contenía grano de trigo y fue disminuyendo según aumentó la cantidad de grano de trigo, excepto en el M5 en frasco. Estos resultados sugieren la

participación de las proteasas sobre los sustratos de desarrollo, ya que el grano de trigo es una fuente de proteína más importante que la paja.

El contenido de proteína soluble del micelio desarrollado sobre caja Petri y frascos presentó la misma tendencia, pero fue mayor en el micelio desarrollado sobre frascos para todos los medios de cultivo. Se observó un incremento en el contenido de proteína al disminuir el contenido de grano de trigo, excepto en el M5, donde el contenido fue mayor que en el M4. Una tendencia similar se observó en los resultados obtenidos sobre la actividad de proteasas en cada uno de los sustratos, es decir una mayor actividad de proteasas a medida que disminuyó la cantidad de grano de trigo en el medio, excepto en el M5. Por otra parte, el contenido de humedad fue muy similar en todos los medios de cultivo, por lo que la humedad de las hifas es independiente del medio de cultivo.

En relación a los resultados obtenidos en la fase de producción de cuerpos fructíferos en planta piloto, se observó una mayor eficiencia biológica cuando se utilizó el M3 como semilla, (mezcla compuesta por 50% de paja de trigo y 50% de grano de trigo) y fue muy similar al emplear M5, es decir micelio desarrollado sobre 100% grano de trigo (experimento control). De igual forma Muthukrishnan y cols. (2000) encontraron que cuando prepararon semilla para la producción de *P. sajor-caju*, empleando mezclas de desechos de la producción de arroz y desechos de la producción de la larva, obtuvieron mayor número de cuerpos fructíferos en concentraciones de 75% + 25% y de 50% +50%, respectivamente. En esta investigación, los resultados obtenidos en el cultivo sugieren que al sustituir en un 50% el grano de trigo por paja de trigo, se obtienen resultados similares a los obtenidos empleando semilla tradicional (elaborada con 100% grano de trigo), con menores costos de producción, ya que la paja es aproximadamente 6 veces más barata que el grano de trigo. Por otro lado, la productividad es independiente de la cantidad de paja presente en la semilla, sólo dependió de la presencia de grano de trigo, ya que en los cultivos con semilla preparada sólo con paja, la productividad

disminuyó un 30% con respecto de los demás tratamientos, los cuales no mostraron diferencia significativa entre ellos.

Se han realizado diversos estudios para desarrollar semilla de *Pleurotus* que sea de alta calidad y producida a bajo costo. En algunos se ha sugerido el empleo de rastrojos de cereales en lugar de los granos de estos o bien mezcla de diferentes sustratos, con el objeto de abaratar el costo de producción. Sin embargo en esas investigaciones no se han obtenido resultados objetivos en cuanto a la productividad del cultivo empleando la semilla elaborada (Yang 1986, Gibriel y cols. 1996, Muthukrishnan y cols. 2000, Leifa y cols. 2004).

Otro aspecto importante a destacar en esta investigación consiste en el estudio de las enzimas producidas en el inóculo, ya que la mayoría de estudios enzimáticos se han realizado sobre los sustratos de cultivo (Kirk y Cullen 1998, Leonowicz y cols. 1999, Pointing 2001). La evaluación de la productividad y actividad enzimática de la semilla podría ser de gran utilidad para la elaboración de semilla altamente productora, empleando diferentes sustratos de la región. Además, el conocimiento sobre la bioquímica del organismo en estos sustratos, permitiría la selección de cepas que presenten una importante actividad enzimática para sustratos específicos. En este trabajo se muestra la posibilidad de abaratar los costos de producción de la semilla y también aprovechar otros sustratos naturales para su preparación sin la pérdida de su capacidad de producción.

3. CONCLUSIONES

1. Las mayores VR y VL se observaron cuando el micelio del hongo se desarrolló sobre el M3 (extractos y semilla preparada con 50% de paja + 50% de trigo respectivamente). Lo que indica que el M3 es el mejor medio de cultivo para desarrollar la semilla. Igualmente, VR y VL mostraron una alta correlación ($r^2 = 0.92$)
2. Las mezclas de paja y trigo con las que se prepararon los inóculos, no parecen influir en la productividad de *Pleurotus ostreatus* 3526, pero mostraron una productividad semejante a la obtenida con la semilla tradicional elaborada con trigo. Sin embargo, estas mezclas permiten reducir el costo de la semilla con lo que la hipótesis queda confirmada.
3. Las productividades en los tratamientos fueron semejantes excepto en el tratamiento M1 que mostró diferencia significativa y fue la menor.

10. PERSPECTIVAS

A partir de esta investigación, se propone realizar estudios que permitan establecer relaciones entre actividades enzimáticas intracelulares y extracelulares para obtener un perfil más definido del comportamiento de *Pleurotus ostreatus* 3526 y otras cepas que se sometan a estudio, con respecto a su productividad, empleando como inóculos mezclas a diferentes proporciones de paja y grano de trigo. Sumado a esto, las evaluaciones sensoriales que se realicen a los cuerpos fructíferos, permitirán establecer si las propiedades organolépticas de éstos, se mantienen.

Otro aspecto que también se puede investigar, consiste en el aislamiento y purificación de enzimas excretadas al sustrato. En especial, las enzimas que han mostrado propiedades importantes en su efecto degradador de sustancias recalcitrantes, ya que muchas de estas son contaminantes de suelos o aguas. Para el efecto, será necesario desarrollar procedimientos de extracción, primeramente en laboratorio, y su posterior escalamiento a nivel de planta piloto.

Podría utilizarse la VR de los hongos desarrollados en cajas de Petri para predecir la productividad que tendrán las cepas en planta de producción.

Finalmente, y considerando que se conocen unas dos mil especies de hongos susceptibles de ser cultivados, se pueden continuar con investigaciones que eventualmente, permitan la incorporación de un mayor número de hongos comestibles o para otros usos, al consumo y que sean la base de industrias que generen empleos y progreso.

11. REFERENCIAS

- Abrams J. 1965. Nutrición Animal y Dietética Veterinaria 934 – 953. Acribia. México.
- AOAC. 1990. Método oficial de análisis de la Association of *Official Analytical Chemists*, 15th Ed. Arlington. USA.
- Ardon O, Kerem Z y Hadar Y. 1998. Enhancement of lignin degradation and laccasa activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *J Microbiol* 44, 676-680.
- Bartnicki-Garcia S, Hergert F y Gierz G. 1989 Computer-simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* 153, 46-57.
- Bautista J y Alanis G. 1998. Chemical composition of three Mexican strain of *Pleurotus ostreatus*. *Archives of Latinoamerican Nutrition* 48(4): 359-363.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Analytical Biochem* 72: 248-254.
- Breene WM. 1990. Nutricional and medicinal value of speciality mushrooms. *J.Food Protec.* 53(10): 883-8949.
- Chang ST y Hayes WA 1978. The biology and cultivation of edible mushrooms. 1st edn. Academic Press, New York.
- Chang ST y Miles PG. 1989. Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida.

- Chang ST y Miles PG. 1987. Historical record of the early cultivation to *Lentinus* in China. *Mush. J. Tropics* 7: 31-37.
- Chang ST. 1991. Cultivated mushrooms. In *Foods and feeds, Handbook of Applied Mycology*. Marcel Dekker: New York. 3: 221-240.
- Chen MM. 2000. Cultivation techniques for *Dictyophora*, *Polyporus umbellata* y *Coprinus cinereus*. *Mushroom Science* 2: 543-558.
- Deshpande V. 1992. Proteinases in fungal morphogenesis. *World J Mycol Biotechnol* 8: 242-250.
- Fasidi I, Isikhuemhen O y Zadrzil F. 1996. Bioreactors for Solid State Fermentation of Lignocellulosics. *J Scientific Ind Res* 55: 450-456.
- Flores J. 1989. *Bromatología Animal*. Editorial LIMUSA, México. pp. 157-263.
- Galicia RE. 1994. Sistematización del cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Posgrado, Proyecto de Estudios Sociales, Tecnológicos y Científicos, IPN., México.
- Gibriel AY; Ahmed M, Rasmy N, Rizk I y Abdel-Rehem NS. 1996. Cultivation of Oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.): Evaluations of different media and organic substrates. In: *Mushroom Biology and Products Proceedings of Second International Conference* (Ed. Daniel J. R.). College of Agricultural Science, University Park Pennsylvania. pp. 415-421.
- Griffin H. 1994. Introduction to the fungi. En *Fungal Physiology*. Wiley-Liss. New York. pp. 1-22.

Guinberteau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons. Francia. pp. 48, 261-264.

Guzmán G. 1980. Identificación de los Hongos comestibles, venenosos y alucinantes Limusa México.

Guzmán G. 1993. El cultivo de hongos comestibles. México D. F. IPN. pp. 1-13.

Hawksworth L, Kirk M, Sutton C y Pegler N. 1995. Ainsworth and bisby's dictionary of the fungi. International Mycological Institute. Cambridge, University Press. pp. 520-529.

Herrera T y Ulloa M. 1998. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica, México, D.F.

Houdeau G. 1991. Improvement of *Pleurotus* cultivation. Science and Cultivation of Edible Fungi, Maher, Blekema, Rotterdam.

Huttermann A. 1988. Removal of chlorophenols and chlorolignins from bleaching effluent by combined chemical and biological treatment. Water Sci Techn 20: 161-170.

Jennings H. 1996. Fungal Biology: Understanding the fungal life style. Bios Scientific, Guildford UK.

Kirk KT y Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetic of wood degradation by white-rot fungi. En: Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry.

- Klein K. 1996. Pattern formation and development of the fungal mycelium. *Patterns in fungal development* (Ed. Sui-Wai Chiu y David Moore). Cambridge, University Press. Great Britain. pp. 70-82.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soy bean trypsin inhibitor: General properties. *J Gen Physiol* 30: 291-310.
- Laborde J. 1995. Dossier Peurote. INRA, Centre de Recherches de Bordeaux station de Recherches sur les Champignons, Bordeaux, France.
- Leifa F, Pandey A y Soccol C. 2004. Cultivation of *Pleurotus* sp, on coffe residues. Disponible en WSMBMP home page.
- Leonowicz A, Matuszawska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtaś- Wasilewska M, Cho N, Hofrichter M y Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- Luo Tai Xun. 1997. The CC100 *Coprinus comatus* characters and the techniques of cultivation spawn rapidly. *Edible Fungi* 4: 16.
- Mai Li Ping, Wu Min Fang y Wu chao Ming. 1997. The outdoor cultivation techniques of *Dictyophora*. *Edible Fungi*. 5: 27-28.
- Martínez-Carrera D. 2000. Potencial de la población rural de hongos comestibles en México. Simposium de los hongos en los sistemas productivos (Ed. Fundación Produce Tlaxcala A.C. CICB y UAT). México. pp8.

Martínez-Carreara D, Leven R, Morales P, Sobal M y Saavedra L. 1991. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México. *Ciencia y desarrollo* 16(96): 33-43.

Martínez-Carrera D, Larque-Saavedra A, Morales P, Sobal M, Martínez W y Aguilar A. 1993. Los hongos comestibles en México: Biotecnología de su reproducción. *Ciencia y Desarrollo* 18(108): 41-49.

Matiru V y Quimio TH. 1992. Enhancement of growth of *Volvariella volvacea* (bull. Ex Fr.) Sing on sawdust. *Mush Res* 1:65-141.

Moore D. 1998. *Fungal Morphogenesis*. Cambridge, University Press. New York.

Morais MH, Ramos AC, Matos N y Santos OEJ. 2000. Production of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) on lignocellulosic residues. *Food Sci Tech In* 6(2):123-128.

Morales P, Martínez-Carrera D y Sánchez W. 1991. Cultivo de Shiitake sobre diversos sustratos en México. *Micología Neotropical Aplicada*, CONACYT, Colegio de Posgraduados, ORSTOM.

Mori S, Nakagawa-Yoshida K, Tsuchihashi H, Koreeda Y, Kawabata M, Nishiura Y, Ando M y Osame M. 1998. Mushroom worker's lung resulting from indoor cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Occup Med* 48: 465-468.

Muthukrishnan N, Venugopal MS y Janarthanan R. 2000. Recycling spent larval food of *Corcyra cephalonica* Stainton for preparing spawn and sporophore of *Pleurotus sajor-caju* (fr.) Singer. *World J Microbiol Biotechnol* 16: 265-270

Niederpruem J. 1978. Morphogenetic processes in *Schizophyllum* and *Coprinus*. *Genetics and Morphogenesis in the Basidiomycetes* (Ed. M. N. Schwalb y P. G. Miles). Academic Press. New York. pp. 105-134.

Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by write-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 20-33.

Ponce L y Muñoz G. 1999. Enriquecimiento proteico de residuos lignocelulosicos con *Pleurotus ostreatus* para alimentación animal. En *Biotecnología Agrícola y Vegetal, Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería 2*, Ed. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería). México. pp. 563.

Poppe J. 2000. Use of the agricultural waste materials in the cultivation of mushrooms. *Mush Sci* 15: 3-23.

Quimio TH. 2002. Updates on spawn production of *Volvariella volvacea*, the tropical straw mushroom. *Mushroom Biology and Mushroom products*. Sánchez J.E., Huerta G. y Montiel E. (eds.). Cuernavaca, México. pp 337-343.

Rajarathnam S y Bano Z. 1987. *Pleurotus* mushrooms breeding and cultivation, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 26(2): 157-223.

Rajarathnam S y Bano Z. 1989. *Pleurotus* mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic waste: Comercial applications and implications. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, 28: 31-107.

Ramot O, Cohen-Kupiec R y Chet I. 2000. Regulation of β -1,3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. *Micol Res* 104: 415-420.

Royse J. D. y Schisler L. C. 1980. Mushrooms. Their consumption, production and culture development. *Interdisciplinary Science Reviews*, vol. 5, No. 4

Saikai T, Tanaka H, Fuji M, Sugawara H, Takeya I, Tsunematsu K y Abe S. 2002. Hypersensitivity pneumonitis by spore of *Pleurotus eryngii* (*eringii*). *Int Med* 41: 571-573

Sánchez C. 1998. Ultrastructural physiological and histological study of *Pleurotus* species. Ph. D. Dissertation. Manchester UK; The University Of Manchester.

Sánchez C 2000. Cultivation substrate determines hyphal ultrastructure during development of *Pleurotus* fruit bodies. *Science and cultivation of edible fungi*. Balkema, Rotterdam, Netherlands. 109-114.

Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushrooms culture technology. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(6): 756-762.

Sánchez C y Moore D. 1999. Conventional Histological stains selectively stain fruit body initials of basidiomycetes. *Mycol Res* 103(3): 315-318.

Sánchez C y Viniestra-González G. 1996. Detection of highly productive strains of *Pleurotus ostreatus* by their tolerance to 2-deoxy-d-glucose in starch-based media. *Mycol Res* 100 (4): 455-461.

Sánchez C, Téllez-Téllez M, Díaz-Godínez G y Moore D. 2004. Simple staining detects ultrastructural and biochemical differentiation of vegetative hyphae and fruit body initials in colonies of *Pleurotus pulmonarius*. *Let Appl Microbiol* 38(6): 483-487.

Senti G, Leser C, Lundberg M y Wuthrich B. 2000. Allergic asthma to shiitake and oyster mushroom. *Allergy* 55:975-976.

Sharma A y Nakas P. 1987. Preliminary characterization of laminarinase from *Trichoderma langibrachiatum*. *Enzyme Microbiol Technol* 9: 89–92.

Smith D y Onions AHS. 1998. The preservation and maintenance of living fungi. Second edition, Surrey England. pp. 122.

Télez-Télez M, Díaz-Godínez G y Sánchez C. 2003. Physiology of a colony of *Pleurotus pulmonarius* grown on medium overlaid with a Cellophane membrane. *Appl Microbiol Biotechnol*. 63:212-216.

Ting S y Chang T. 2002. Past and present trends in the production of *Lentinula edodes* in Asia. *Mushroom Biology and Mushroom products*. Sánchez JE, Huerta G. y Montiel E (eds.). Cuernavaca, México. pp 1–8.

Tripathi J y Yadav. 1992. Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw into animal feed by *Pleurotus ostreatus*: A pilot effort. *Animal Feed Sci Technol*. 37, 59–72.

Yang XM. 1986. Cultivation of edible mushroom in China agriculture. Printing House: Biging, China.

12. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Anastomosis. Abertura, fusión, conexión. Fusión entre dos células en contacto, que reabsorbiendo sus paredes, llegan a confundirse en una. Tienen gran importancia funcional en los hongos, en los que se reconocen anastomosis vegetativas, sexuales y parasitarias.

Aspóricos. Cuerpos fructíferos de un hongo que no forma esporas.

Basidomicetos. Grupo taxonómico de hongos conocido también como Basidiomycetes o Basidiomycotina.

Basidio. Célula del himenio de los Basidomicetos que forman dos o cuatro esporas externamente, a través de prolongaciones del mismo.

Cariogamia. Fusión de dos núcleos celulares haploides, para formar un núcleo diploide.

Contexto. Tejido del cuerpo fructífero, formado por agrupaciones de hifas.

Cruzamiento. Evento sexual que equivale al apareamiento en organismos superiores. Consiste en el intercambio de material genético para obtener un nuevo organismo.

Cuerpo fructífero. También llamado fructificación, esporóforo o simplemente hongo, es la parte reproductora de origen sexual de un micelio.

Dicarión. También conocido como estado dicariótico, es el micelio con dos núcleos en cada célula.

Dicariótico. Micelio con dos núcleos en cada célula, que se forma por la unión de dos micelios monocarióticos.

Eficiencia biológica. Evaluación de una cepa para producir cuerpos fructíferos en un sustrato. Se expresa como peso fresco de las fructificaciones dividido entre el peso seco del sustrato y se puede reportar en porcentaje.

Esclerocio. Micelio endurecido, oscuro en condiciones naturales, debido a la deshidratación del mismo, provocado por cambios bruscos del medio externo o por envejecimiento.

Esporada. Conjunto de esporas depositadas sobre una superficie.

Esporas. Elementos de propagación y reproducción de los hongos y equivalen a las semillas de las plantas.

Estípite. Equivalente al pie del cuerpo fructífero. Puede ser central, lateral o excéntrico, robusto o delgado.

Fibula. Conexión de tipo gancho o grapa que existe entre dos células en la hifa.

Haploide. Estado en el que los núcleos de las células poseen un solo juego de cromosomas. Se expresa con la letra n.

Heterotalismo. Condición sexual de los hongos heterotálicos en los que la conjugación solo será posible entre dos micelios de dos individuos. Puede haber heterotalismo unifactorial y bifactorial, según exista uno o dos juegos de caracteres genéticos. Al primero también se le llama bipolaridad o heterotalismo bipolar y al segundo tetrapolaridad o heterotalismo tetra – polar.

Hifas. Filamentos tabicados, o no tabicados, cuyo conjunto forma el micelio o las fructificaciones de los hongos. Es la unidad estructural de los hongos.

Himenio. Parte fértil del cuerpo fructífero de un hongo, en donde se producen las esporas. Corresponde a las laminillas que tiene el pileo en su parte inferior.

Homotalismo. Condición sexual de los hongos homotálicos, por conjugación entre el micelio de un solo individuo. Existe homotalismo primario y secundario, según se desarrolle un micelio autofértil de cada monocarión o si se forma de un micelio de una espora con dos núcleos compatibles.

Inóculo. Micelio desarrollado sobre un material determinado, que se usará para sembrar el hongo en otro sustrato.

Macromicetos. Hongos superiores que forman fructificaciones macroscópicas.

Meiosis. Se refiere a la división nuclear que se lleva a cabo en la célula que formará las esporas, es decir, en un basidio, una vez que ha ocurrido la cariogamia.

Micelio. Masa algodonosa, generalmente blanca, formada por el conjunto de hifas. Se distinguen en micelio primario o micelio secundario.

Micorrizico. Tipo de hongo en el que el micelio se une con las raíces de vegetales, en una relación simbiótica.

Micromicetos. Hongos de tipo microscópico, como los mohos y las levaduras, los cuales nunca muestran fructificaciones grandes como los macromicetos.

Mitosis. División nuclear en la que a diferencia de la meiosis, no se reduce el número de cromosomas.

Monocariótico. Micelio que presenta un núcleo en cada célula. También se le llama monocarión. Se origina por la germinación de una espora.

Monospórico. Micelio que proviene de la germinación de una sola espora; puede ser monocariótico o dicariótico.

Multiespórico. Micelio que se obtiene al hacer germinar esporas en dilución sobre una caja de Petri. Los micelios obtenidos de esta forma son dicarióticos.

Mutación. Alteración en la estructura genética de un individuo, la cual se puede reflejar positiva o negativamente en las características morfológicas de los descendientes del mismo. Poco frecuente en los hongos.

Parásito. Organismo que se desarrolla a expensas de otro organismo vivo, el cual puede ser un vegetal, un animal o un hongo.

Píleo. Es el sombrero del cuerpo fructífero de un hongo, el cual lleva en su parte baja el himenio.

Plasmogamia. Es la fusión de dos hifas compatibles para dar origen a una tercera. Es el inicio de la reproducción de los hongos.

Primordio. Futuro cuerpo fructífero de un hongo, es decir, es la fase juvenil del mismo.

Quitina. Polisacárido nitrogenado estructural de la pared celular de animales del grupo de los insectos, arañas, camarones y cangrejos. Se encuentra también en la pared de las hifas de los hongos.

Saprophyto. Literalmente, hierba podrida. Nombre con que se designa a los organismos que se desarrollan sobre materiales orgánicos muertos, sean éstos vegetales o animales.

Sésil. Se dice de las fructificaciones que carecen de pie o estípite.

Sinema. Pequeña fructificación asexual que forma esporas asexuales.

Vegetativo. Se refiere a las partes no reproductoras del hongo. Crecimiento vegetativo indica el crecimiento de las hifas del micelio.

Volva. También llamado copa. Resto de una envoltura general que tuvo el cuerpo fructífero de algunos hongos en la base del pie o estípite.