



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Ultraestructura y propiedades bioquímicas
de hifas de la fase micelial y de cuerpo
fructífero de *Pleurotus ostreatus***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

José Luis Suárez Segundo

Director de tesis:

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2013



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Ultraestructura y propiedades bioquímicas
de hifas de la fase micelial y de cuerpo
fructífero de *Pleurotus ostreatus***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

José Luis Suárez Segundo

Director:

Dra. Ma. Del Carmen Sánchez Hernández

Asesores

Dra. Maura Téllez Téllez

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dr. Saúl Tlecuítl Beristain

M. en C. Rubén Díaz Godínez



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que José Luis Suárez Segundo 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 correspondiente. El título que llevará es "Ultraestructura y propiedades bioquímicas de hifas de la fase micelial y de cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*".

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., ENERO 8 DE 2013

DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

DR. SAUL TECUITZIL BERISTAIN



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-8001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-87 e-mail: posgradoctbea@igmail.com
Tlaxcala, Tlax.

A G R A D E C I M I E N T O S:

Al Posgrado del CTBC, UAT.

Al CONACYT por la beca otorgada.

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Ma. Del Carmen Sánchez Hernández

Dra. Maura Téllez Téllez

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Dr. Saúl Tlecuitl Beristain

M. en C. Rubén Díaz Godínez

Dr. José David Sepúlveda Sánchez

Dr. Jorge Sepúlveda Sánchez

**Agradezco principalmente a Dios
que me ha permitido llegar hasta este día
y poder presentar esta tesis.**

Agradezco muy especialmente.

**A la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández,
Por la dirección de esta tesis y por su apoyo moral
Y académico para que esta tesis se llevara a cabo.**

**A todos mis amigos,
Los cuales colaboraron de alguna manera con este trabajo.**

Esta tesis es dedicada a mi mamá

María lucía Segundo Venancio

En especial, por darme la vida y permitir llamarle mamá

A mis hermanos:

Juanita

Andrea

Marco Antonio

RESUMEN

En este trabajo se emplearon primordios y cuerpos fructíferos del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (“seta”). Las fructificaciones se obtuvieron en cristalizadores que contenían agar papa dextrosa. Los cristalizadores fueron inoculados con un fragmento de micelio de 4 mm de diámetro e incubados por 12 días a 28 °C. Por otro lado la fase vegetativa o micelial de este organismo fue estudiada en cajas Petri conteniendo agar papa dextrosa que fueron inoculadas de manera similar a los cristalizadores e incubadas a 28 °C. Se estudiaron cuerpos fructíferos en diferentes estados de desarrollo; 0.5, 1.0, 2.0 y 4 mm de longitud y de la fase vegetativa la zona madura (zona central de la colonia) y la zona joven (periferia) de la colonia. Para los análisis de ultraestructura, se colectaron muestras de los diferentes cuerpos fructíferos, realizando cortes para evaluar el diámetro y grosor de las hifas empleando microscopía electrónica de transmisión. En ambas fases de crecimiento se evaluó; actividad enzimática, contenido de glicógeno y en la pared celular el contenido de glucanos insolubles en álcali (R) y solubles en álcali (S). La fase vegetativa presentó la mayor actividad enzimática (lacasas, proteasas y celulasas) lo cual sugiere que la presencia de estas enzimas es más importante en el desarrollo micelial en comparación con la fase fructífera. Sin embargo, la fase reproductiva presentó mayor cantidad de R-glucanos y S-Glucanos que la fase vegetativa del hongo, lo que indica que la pared celular de esta fase presenta una pared celular más gruesa. En este estudio se obtuvieron diferencias entre el diámetro de la hifa y grosor de pared celular en la fase vegetativa y fructífera, debido a sus diferentes etapas de madurez.

Por otro lado, se obtuvo mayor cantidad de glicógeno en la zona joven de la fase vegetativa y en el cuerpo fructífero de 0.5 mm, lo que sugiere que en esta zona y fase se encuentra una mayor cantidad de citoplasma debido a un mayor metabolismo celular que posteriormente es utilizado en el desarrollo del micelio y de los cuerpos fructíferos. Estos estudios representan una contribución importante al conocimiento sobre las funciones y propiedades de las hifas responsables del desarrollo de la fase vegetativa, así como las formadoras del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CICLO DE VIDA DEL GÉNERO <i>PLEUROTUS</i>	2
1.2. IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LA PRODUCCIÓN DE HONGOS COMESTIBLES.....	4
1.3. IMPORTANCIA ALIMENTARIA DE LOS BASIDIOMICETOS.....	5
1.4. FUNCIÓN DEL GLICÓGENO EN BASIDIOMICETES.....	6
1.5. ENZIMAS.....	6
1.5.1. LACASAS.....	7
1.5.2. PROTEASAS.....	7
1.5.3. QUITINASAS.....	7
1.5.4. GLUCANASAS.....	8
1.5.5. CELULASAS.....	8
1.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	9
1.6.1. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN.....	9
1.6.2. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA OBSERVARLAS AL MICROSCOPIO.....	10
2. ANTECEDENTES.....	11
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	14
4. JUSTIFICACIÓN.....	14
5. OBJETIVO GENERAL.....	14
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1. ORGANISMO Y REACTIVACIÓN DE LA CEPA.....	15
6.2. OBTENCIÓN DE LOS CUERPOS FRUCTÍFEROS Y FASE VEGETATIVA DE <i>P. ostreatus</i>	15
6.3. ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LAS FASES DE DESARROLLO DEL CUERPO FRUCTÍFERO Y LA FASE VEGETATIVA DE <i>P. ostreatus</i> EMPLEANDO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	16
6.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA ZONA JOVEN Y MADURA DE LA FASE VEGETATIVA Y DEL CUERPO FRUCTÍFERO.....	16
6.4.1. ANÁLISIS ENZIMÁTICO DE LAS COLONIAS DE <i>P. ostreatus</i>	16
6.4.2. DETERMINACIÓN DE LACASAS INTRACELULARES.....	16
6.4.3. DETERMINACIÓN DE PROTEASAS INTRACELULARES.....	17

6.4.4. DETERMINACIÓN DE GLUCANASAS INTRACELULARES	17
6.4.5. DETERMINACIÓN DE ENDOCELULASAS INTRACELULARES	17
6.4.6. DETERMINACIÓN DE QUITINASAS INTRACELULARES	18
6.4.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLICÓGENO INTRACELULAR	18
6.4.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCANOS DE LA PARED CELULAR.....	18
6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
7. RESULTADOS	20
7.1. ULTRAESTRUCTURA DEL MICELIO VEGETATIVO Y DE LAS FASES DE DESARROLLO DEL CUERPO FRUCTÍFERO DE <i>P. ostreatus</i>	20
7.1.1. ZONA JOVEN Y MADURA DE LA FASE VEGATATIVA	20
7.2. ETAPAS DE DESARROLLO DE LA FASE FRUCTÍFERA	23
7.2.1. CUERPO FRUCTÍFERO DE 0.5 mm	23
7.2.2. CUERPO FRUCTIFERO DE 1 mm	26
7.2.3. CUERPO FRUCTÍFERO DE 2 mm	30
7.2.4. CUERPO FRUCTIFERO DE 4 mm	33
7.3. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS	37
8. DISCUSIÓN.....	41
9. CONCLUSIONES.....	44
10. PERSPECTIVAS	45
11. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Fase vegetativa y reproductiva del género <i>Pleurotus</i> .	2
Fig. 2. Ciclo de vida de <i>P. ostreatus</i> .	3
Fig. 3. Diámetro de hifa entre la zona joven y madura.	19
Fig. 4. Grosor de pared celular de la hifa entre la zona joven y zona madura.	20
Fig. 5. Hifas de la zona joven y madura de la fase vegetativa del hongo <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica (100 μm).	21
Fig. 6. Hifas de la zona joven y madura de la fase vegetativa del hongo <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica (2 μm).	22
Fig. 7. Diámetro de la hifa del hongo de 0.5 mm entre la base y estípite.	23
Fig. 8. Grosor de la pared celular en la hifa del hongo de 0.5 mm entre la base y estípite.	23
Fig. 9. Hifas de la base y estípite del cuerpo fructífero de 0.5 mm de <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica de transmisión (100 μm).	24
Fig. 10. Hifas del estípite del cuerpo fructífero de 0.5 mm de <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica de transmisión (2 μm).	25
Fig. 11. Diámetro de la hifa del hongo de 1 mm entre la base, estípite y píleo.	26
Fig. 12. Grosor de la pared celular en las hifas del hongo de 1 mm entre la base, estípite y píleo.	26
Fig. 13. Hifas de la base y píleo del cuerpo fructífero de 1 mm de <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica de transmisión (100 μm).	28
Fig. 14. Hifa del estípite del cuerpo fructífero de 1 mm de <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica de transmisión (2 μm).	28
Fig. 15. Diámetro de la hifa del hongo de 2 mm entre la base, estípite y píleo.	29
Fig. 16. Grosor de la pared celular en las hifas del hongo de 2 mm entre la base, estípite y píleo.	30
Fig. 17. Hifas de la base, estípite y píleo del cuerpo fructífero de 2 mm de <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica de transmisión.	31
Fig. 18. Hifas del estípite del cuerpo fructífero de 2 mm de <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica de transmisión (2 μm).	32

Fig. 19 Diámetro de la hifa del hongo de 4 mm entre la base, estípite y píleo.....	33
Fig. 20. Grosor de la pared celular en las hifas del hongo de 4 mm entre la base, estípite y píleo.....	33
Fig. 21. Hifas de la base, estípite y píleo del cuerpo fructífero de 4 mm de <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica de transmisión (100 µm).....	35
Fig. 22. Hifa del estípite del cuerpo fructífero de 4 mm de <i>P. ostreatus</i> empleando microscopia electrónica de transmisión (100 µm).....	35
Fig.23. Actividad enzimática de lacasas de <i>P. ostreatus</i>	36
Fig. 24. Actividad enzimática de proteasas de <i>P. ostreatus</i>	37
Fig. 25. Actividad enzimática de glucanasas de <i>P. ostreatus</i>	37
Fig. 26. Actividad enzimática de endocelulasas de <i>P. ostreatus</i>	37
Fig. 27. Actividad enzimática de quitinasas de <i>P. ostreatus</i>	38
Fig. 28. Contenido de glicógeno intracelular de <i>P. ostreatus</i>	38
Fig. 29. Contenido de S (1) y R (2) glucanos en la pared celular de <i>P. ostreatus</i>	39

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos tradicionalmente se han definido como organismos eucarióticos, productores de esporas, sin clorofila, con nutrición heterótrofa por absorción, capaces de reproducirse sexual y/o asexualmente, cuyos filamentos usualmente son estructuras somáticas ramificadas conocidas como hifas y típicamente son rodeadas por una pared celular rígida (Guzmán y cols. 1993, Alexopoulos y cols. 1996). De manera general, los hongos son organismos cosmopolitas capaces de vivir en casi todos los hábitats posibles aunque también existen especies endémicas de alguna región determinada. Todos los hongos son heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica preformada que utilizan como fuente de carbono y energía. La pared rígida (compuesta en mayor proporción por quitina y otros polisacáridos estructurales) con la que cuenta la mayoría de las especies fúngicas ligninocelulósicas, les impide fagocitar su alimento y por ello deben absorber nutrientes simples y solubles que obtienen mediante la degradación de biopolímeros tales como celulosa, hemicelulosa y lignina, por acción de un complejo sistema de enzimas hidrolíticas que liberan al medio (Guzmán y cols. 1993, Deacon, 1993, Moore-Landecker 1996). Al conjunto de hifas ramificadas de los hongos se le conoce como micelio, mismo que puede encontrarse en forma monocariótica (un solo núcleo) o dicariótica (dos núcleos). En el caso de los basidiomicetos, bajo condiciones fisiológicas y ambientales específicas, el micelio dicariótico comienza a formar estructuras reproductoras denominadas cuerpos fructíferos (también llamados carpóforos, esporóforos o basidiocarpos) (Futoshi y cols. 2004). En el cuerpo fructífero de los hongos macroscópicos, el estípite o pie y el característico píleo o sombrero están conformados por micelio ramificado; en la parte inferior del píleo se encuentran las laminillas, mismas que constituyen el himenio, lugar donde se forman y se liberan las esporas una vez que el cuerpo fructífero ha madurado (Fig. 1).

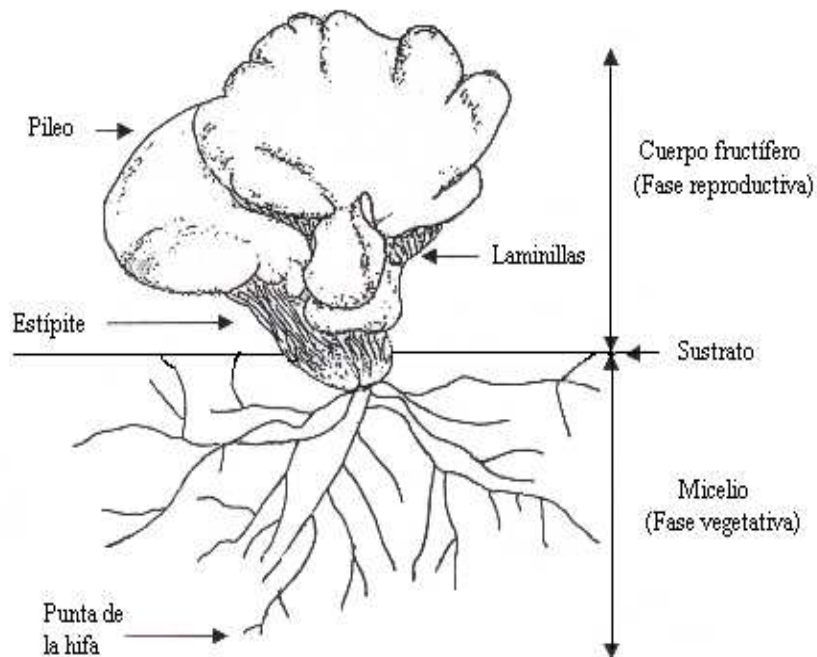


Fig. 1. Fase vegetativa y reproductiva del género *Pleurotus* (Sánchez 1998).

De manera general, se considera que las especies del género *Pleurotus* poseen cuerpos fructíferos con un píleo liso o algo escamoso hacia el centro, en forma de embudo, de pétalo de flor o de concha de ostra, con himenóforo lamelado y de consistencia típicamente carnosa o correosa; de colores que van desde el grisáceo, café y hasta rosados; el estípite (sésiles), es lateral o excéntrico y corto aunque a veces puede ser mediano o largo; sus láminas son poco o nada unidas entre sí en la base, generalmente decurrentes o en algunos caso subdecurrentes; este es de olor y sabor agradables (Zadrazil 1974, García y cols. 1998, Herrera y Ulloa 1998).

1.1. CICLO DE VIDA DEL GÉNERO PLEUROTUS

El ciclo de vida de *Pleurotus* (Fig. 2), implica una sucesión de etapas que van desde la germinación de las esporas hasta la formación de cuerpo fructífero. En condiciones adecuadas las esporas germinan y dan lugar al micelio.

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales: 1) el homotalismo: los que pertenecen a este grupo son auto compatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio y 2) el heterotalismo: son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este 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 fibulas (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) (Olivier-Laborde 1991).

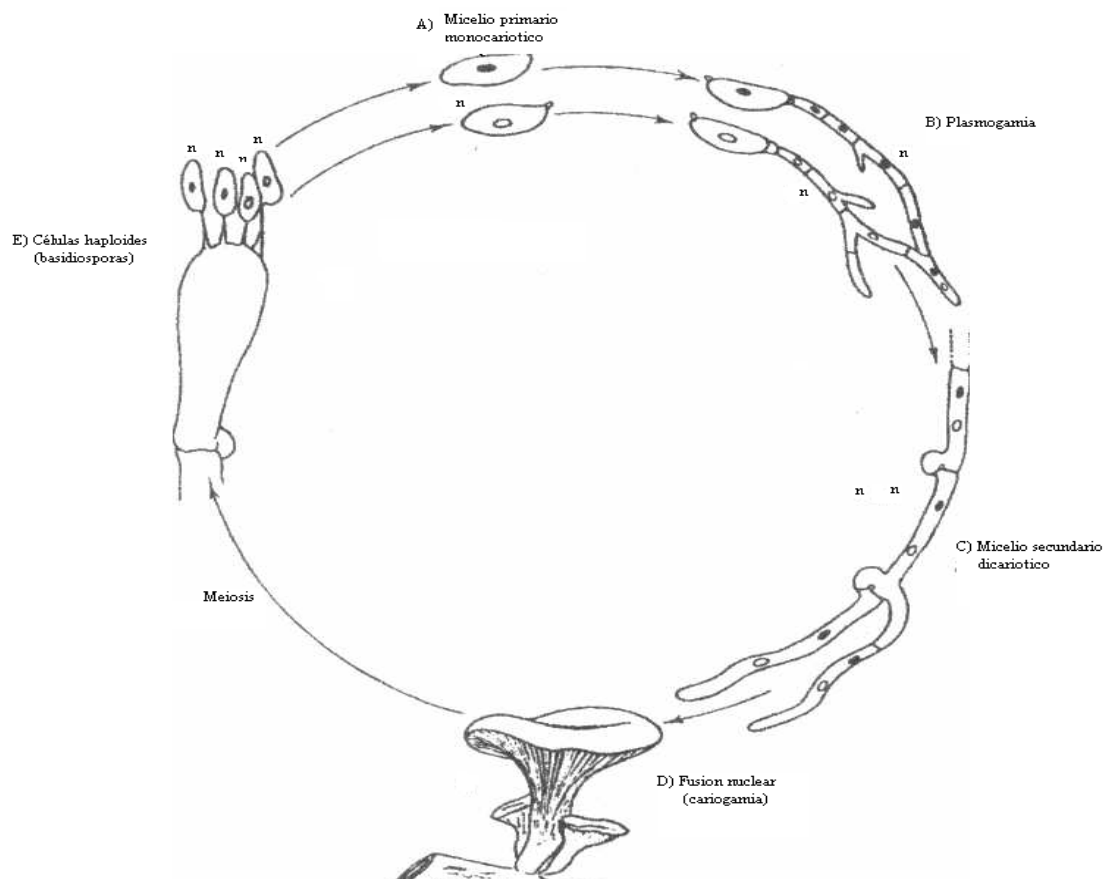


Fig. 2. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*.

1.2. IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LA PRODUCCIÓN DE HONGOS COMESTIBLES

El cultivo de hongos comestibles es una industria biotecnológica en continuo proceso de expansión que poco a poco va cobrando mayor importancia en el ámbito económico de muchos países. Hasta 1980, las cuatro especies de hongos comestibles más importantes por su cultivo eran *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus* spp. (Seta, ostra), *Lentinula edodes* (Shiitake) y *Volvariella volvacea*. Desde entonces el género *Agaricus* ha sido el hongo comestible más cultivado y consumido en Europa, Norteamérica y México. Por su parte, *Lentinula edodes* es producido en su mayor parte en Japón, *Volvariella* en países Asiáticos y *Pleurotus* en México y Sudamérica, este organismo es el segundo hongo comestible más cultivado a nivel mundial (Sánchez 2010). En lo que se refiere a los hongos del género *Pleurotus*, han incrementado su popularidad en los últimos años, debido a su habilidad para crecer en un amplio intervalo de temperaturas (22-28°C) y su capacidad para utilizar como sustrato diversos materiales ricos en lignina y celulosa tales como rastrojo de maíz, papel (Baysal y cols. 2003), paja de cereales (Bonatti y cols. 2004), pulpa de café (Salmones y cols. 2005), viruta de madera (Pérez y Mata, 2005), residuos vegetales así como desechos ligninocelulósicos de la industria alimenticia (Cohen y cols. 2002, Shashirekha y cols. 2002), para la preparación y acondicionamiento de estos sustratos, se han utilizado varias técnicas tales como la inmersión en agua caliente, pasteurización, esterilización con inyección de vapor y composteo. Se consideran que cada cepa tiene un potencial bioquímico distinto, por ejemplo, en la degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual puede ser utilizado como criterio para identificar la calidad de cepas que sean convenientes para programas de hibridación (Vogel y Salmones 2000, Valencia-del Toro 2003, Moda y cols. 2005). Por otro lado, *Pleurotus* y muchos otros basidiomicetos, producen compuestos de interés industrial tales como ácidos orgánicos (Takao 1965), vitaminas, aminoácidos, enzimas (Cohen y cols. 2002) y otros metabolitos secundarios (Marino y cols. 2003). Gracias a estas características, los hongos tienen diversas aplicaciones en distintos ámbitos biotecnológicos tales como el ambiental, farmacológico y alimentario.

1.3. IMPORTANCIA ALIMENTARIA DE LOS BASIDIOMICETOS

En lo que respecta al campo alimentario, los hongos comestibles y en especial los del género *Pleurotus*, constituyen una buena fuente de nutrientes; sin embargo, se ha reportado que la composición química de los cuerpos fructíferos, depende básicamente del tipo de cepa, la composición del sustrato (solo o suplementado), técnicas de cultivo, así como la edad y etapa de desarrollo del hongo (Cardona 2001, Moda y cols. 2005). Uno de los principales atributos nutricionales de los hongos comestibles es su alto contenido proteico (25%), el cual es equiparable al de la leche (25.2%) y frijol (24.2%) y más alto que el reportado para el arroz (7.3%), maíz (11.2%) y trigo (13.2%) (Martínez-Carrera y cols. 2004). Sin embargo, la calidad proteica de un producto, está determinada por su valor biológico (contenido de aminoácidos esenciales) y digestibilidad más que por el contenido proteínico total. Los cuatro principales hongos comestibles cultivados con fines comerciales en nuestro país, están compuestos por todos los aminoácidos esenciales (Bano y cols. 1963, Martínez-Carrera y cols. 2004) y ellos comprenden del 25 al 40% del contenido total de proteína (Crisan y Sands 1978). También, se ha determinado en promedio un 98% de digestibilidad proteica en diferentes cepas del género *Pleurotus* (Valencia-del Toro y cols. 2006) lo que corrobora que las proteínas de estos organismos, son de alta calidad. Además de su alto contenido proteico, los cuerpos fructíferos de los basidiomicetos están compuestos de carbohidratos (incluyendo fibra dietética tales como D-glucanos, quitina y sustancias pécticas), minerales y vitaminas, así como un bajo contenido de grasa el cual fluctúa entre el 3 y el 5% total en base seca (Sturion y Oetterer 1995, Justo y cols. 1998, Manzi, y cols. 1999, Bonnati y cols. 2004) con predominancia en el píceo y de la cual, entre 70 y 80% corresponden al ácido linoleico de esta forma, el consumo de los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles resulta muy adecuado debido a que aporta un buen número de nutrientes básicos para la dieta humana.

1.4. FUNCIÓN DEL GLICÓGENO EN BASIDIOMICETES

El glicógeno es el material de reserva energética de las células de los hongos y de los animales. Es muy similar al almidón, pero es un polímero muy ramificado compuesto de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α (1-4) y con ramificaciones aproximadamente cada 10 unidades formadas por enlaces glucosídicos α (1-6), éste es degradado por una fosforilasa, la cual elimina secuencialmente un residuo de glucosa a la vez de cualquier terminal no reductor, en forma de glucosa 1-fosfato para uso metabólico.

El glicógeno es almacenado en la base de los cuerpos fructíferos en varios estados iniciales del crecimiento (Niederpruem 1970). En el desarrollo de los cuerpos fructíferos la acumulación del glicógeno en el estípite disminuye a medida que éste se incrementa en las laminillas. Primero se almacena en la base del estípite y posteriormente desaparece de esta zona conforme incrementa en el píleo (Matthews y Niederpruem 1973). La acumulación y degradación de glicógeno es una parte integral de la meiosis y se encuentra disponible para ser utilizado para el desarrollo del cuerpo fructífero (Ji y Moore 1993). Por otra parte, está involucrado en diversos aspectos de morfogénesis vegetativa (Jirjis y Moore 1976).

1.5. ENZIMAS

La secreción de proteínas estructurales y enzimas juegan un papel muy importante en los hongos. Las enzimas son liberadas desde la membrana citoplasmática hacia el espacio periplasmático, donde pueden ser incorporadas a la membrana citoplasmática o pared celular, también pueden ser excretadas a través de la pared celular hacia el medio externo (Peberdy 1990). Las enzimas son proteínas catalíticas producidas por las células vivas. Cabe mencionar que la digestión de los alimentos se lleva a cabo por varias reacciones químicas, biosíntesis de macromoléculas, liberación y utilización de energía y otros procesos que son catalizados por las enzimas. Estas tienen estructuras inestables; su solubilidad y actividad catalítica se pueden ver afectadas por factores físicos (calor, congelación y radiación), químicos (oxidación, reducción, disolventes orgánicos, iones

metálicos, fuerzas iónicas y pH) y biológicos (proteólisis, modificación y degradación enzimática) (Murray y cols. 1992).

1.5.1. LACASAS

Las lacasas son de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde el siglo XIX, inicialmente fue obtenida del exudado del árbol Japanese lacquer (*Rhus vernicifera*) y descrita por Yoshida en 1883, posteriormente Bertrand y Laborde (1896) demostraron por primera vez la actividad de lacasas en hongos, éstas son proteínas que requieren cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos mediante la transferencia de un electrón resultando la formación de radicales libres (Claus 2003) lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, dipolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (Edens y cols. 1999). La función fisiológica de estas enzimas no ha sido comprendida totalmente; se ha reportado que en plantas, las lacasas participan en la lignificación y en hongos en la morfogénesis (formación de esporas, formación de pigmentos de los cuerpos fructíferos), patogénesis, virulencia de los hongos y en la degradación de lignina, aunque también se ha reportado actividad de lacasas en algunos insectos y bacterias (Galhaup y cols. 2002).

1.5.2. PROTEASAS

Las proteasas son las enzimas encargadas de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas. Dependiendo del sitio de la hidrólisis del enlace peptídico se agrupan en: proteínasas que hidrolizan el enlace peptídico al centro y las peptidasas que hidrolizan el enlace en los extremos de la proteína y se les denomina proteasas, cuando aún no han sido caracterizadas (García-Carreño y cols. 1996). Las proteasas pueden crear zonas flexibles en la pared celular de las hifas de los hongos, las cuales pueden ser empujadas por el citoplasma y así originar una ramificación.

1.5.3. QUITINASAS

Las quitinasas son enzimas hidrolíticas, que degradan la quitina. Esta reacción involucra a dos hidrolasas: 1) endoquitinasa: que produce monómeros solubles en N-acetilglucosamina (NAG) de bajo peso molecular así como el dímero N-diacetil

quitobiosa, que es predominante, ésta rompe la cadena al azar en puntos internos de la molécula de quitina y 2) las exoquitinasas: que hidrolizan los intermediarios hacia NAG y rompen la cadena en la parte final no reductora de la quitina (Cole y cols. 1995).

1.5.4. GLUCANASAS

La mayoría de los β -glucanos de los hongos son degradados por las enzimas β -glucanasas y β -glucosidasa. En algunos hongos estas enzimas se conservan en el espacio periplasmático o en el citoplasma usualmente en las vesículas, que se localizan apicalmente o en los sitios adyacentes de las divisiones de las hifas. Esta localización es conveniente para la función que desempeña en la división de hifas, auto-lisis y otros procesos morfológicos que requieren de alguna modificación en la pared celular como la esporulación y la formación de estructuras reproductivas (Pistón y cols. 1999).

1.5.5. CELULASAS

Las celulasas son un sistema complejo de enzimas que hidrolizan los enlaces β -(1-4), actúan sobre las macromoléculas de celulosa, produciendo celulodextrinas. El sistema celulolítico consiste en: 1) la β -(1-4) glucanohidrolasa que actúa como endoglucanasa, haciendo una incisión en las cadenas de celulosa para producir glucosa y oligosacáridos y 2) la β -(1-4) celobiohidrolasa tiene actividad de exoglucanasa, al atacar la parte final no reducida de la celulosa, forma celobiosa y 3) la β -glucosidasa la cual degrada la celobiosa (Peczynska-Czoch y Mordarski 1988). Este complejo enzimático de la hidrólisis de celulosa en glucosa se ha utilizado para optimizar la extracción de aceites esenciales, también para ablandar tejidos celulósicos de verduras y frutas así como para rehidratar diversos productos (Badui 1994). Este complejo también es importante en la degradación de sustratos lignocelulósicos como paja y desechos de la producción de cereales. Durante el desarrollo de *Pleurotus* sobre residuos agrícolas la actividad de las celulasas es alta al iniciar la formación del cuerpo fructífero y decrece su actividad al disminuir ésta (Rajarathnam y Bano 1989).

1.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

A mediados del siglo XX, se inventó un tipo de microscopio que utiliza como fuente de iluminación los electrones. Con este equipo se puede realizar un estudio más detallado de la célula y los elementos subcelulares, moleculares y atómicos.

El microscopio electrónico al emplear una fuente de emisión de electrones, de una longitud de onda de 0.005 nm, puede alcanzar valores resolutivos mucho mayores que el alcanzado por los microscopios ópticos. El límite de poder de resolución del microscopio electrónico es de 0.2 nm.

1.6.1. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

Los electrones al tener una longitud de onda muy pequeña (0.005 nm) permiten a este instrumento un alto poder de resolución.

El microscopio electrónico se asemeja en algunos aspectos al microscopio óptico, ya que consta de:

- a) sistema de iluminación.
- b) sistema de manipulación de la muestra.
- c) sistema de formación de la imagen.
- d) sistema de proyección de la imagen.

La fuente de iluminación es un fino filamento de tungsteno (cátodo) que al ser calentado por el paso de una corriente emite electrones, los cuales son desprendidos a gran velocidad al establecerse una diferencia de potencial eléctrico entre el cátodo y el ánodo (este se encuentra cerca del primero), pasando a través de este último por una apertura hacia una columna metálica hueca, donde existe un alto vacío para evitar que los electrones que viajan a través de ella sean difractados por moléculas extrañas. Una vez acelerados los electrones por el ánodo, atraviesan un campo magnético producido por el condensador, el cual concentrará los electrones en un haz fino y lo dirigirá hacia la muestra. Esta última se introduce dentro de la columna por un dispositivo especial que expone el objeto a estudiar al haz de electrones el cual constituye el sistema de

manipulación de la muestra. La muestra se contrasta con sustancias que contienen metales pesados de alta densidad electrónica en sus átomos, los cuales presentan diversas afinidades por determinados componentes celulares; una vez que el haz de electrones atraviesa la muestra, los mismos chocan con la nube electrónica de estos compuestos que se han depositado sobre los componentes celulares lo que produce un retardo y dispersión de la trayectoria de alguno de los electrones, mientras que otros continuarán su trayecto hasta llegar a la pantalla fluorescente, donde se forma la imagen. El dispositivo con la muestra puede moverse en distintas direcciones en un plano perpendicular al eje de la columna o puede ser ligeramente inclinado para algunos estudios en que se requiere este movimiento.

Luego de atravesar la muestra, los electrones pasan inmediatamente a través de la lente objetivo, donde se forma una imagen primaria invertida, la cual es rectificadas por una lente 6 intermedia y proyectada hacia una pantalla fluorescente, formando la imagen final aumentada al chocar los electrones y producirse una emisión de ondas en el rango de la luz visible. Por debajo de esta pantalla existe una cámara fotográfica donde se registran las imágenes, una vez retirada la pantalla fluorescente.

1.6.2. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA OBSERVARLAS AL MICROSCOPIO

Al observar una estructura al microscopio óptico o al electrónico, la luz o los electrones atraviesan la muestra, dando lugar a la formación de imágenes que son ampliadas por las lentes del microscopio. Para esto es necesario que los objetos examinados sean lo suficientemente delgados, para que la luz o los electrones los atraviesen. En el caso de la microscopía óptica las muestras deben tener un grosor de 5-8 μm aproximadamente, y para microscopía electrónica, valores entre 20 y 40 nm. Es necesario, por tanto, cortar el material que ha de ser estudiado en "lascas" muy finas. La preparación del material biológico muerto, para su estudio al microscopio óptico o al electrónico, consta de cuatro pasos fundamentales (fijación, inclusión, corte y coloración).

El término análisis de imágenes es usualmente empleado para procedimientos computarizados y se define como la captura de una imagen, seguida por la cuantificación y clasificación de componentes dentro de ésta (Van de Vooren y cols. 1991). El procesamiento digital de imágenes, para el estudio de micelios de hongos, es una metodología desarrollada recientemente, siendo una técnica muy promisoría (Packer y Thomas 1990, González-Blanco y cols. 1993, Larralde y cols. 1994), puesto que se completa la información química con la morfológica (Larralde-Corona 1992). El análisis de imágenes puede superar a la técnica manual, facilitando el procesamiento de grandes cantidades de material en un tiempo relativamente corto (Baum y Bailey 1987).

2. ANTECEDENTES

El género *Pleurotus* pertenece a los hongos denominados de pudrición blanca, tienen un mecanismo complejo que involucra enzimas que atacan directamente a la lignina. 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). *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* y algunas especies del género *Pleurotus* tienen la capacidad de degradar o desdoblar sustratos lignocelulósicos, debido a la secreción de enzimas extracelulares (lacasas, proteasas, lignin peroxidasas) que le van a permitir su desarrollo fisiológico.

Sánchez y Moore (1998), encontraron diferencias importantes en las hifas de *Pleurotus pulmonarius* desarrolladas en sustratos naturales y sintéticos; las hifas desarrolladas sobre un sustrato sintético como agar con extracto de papa (AEP), presentaron menor contenido de material citoplasmático y una mayor cantidad de vacuolas en comparación con las hifas desarrolladas sobre un sustrato natural (como la paja de trigo), las cuales presentaron mayor contenido de material citoplasmático y un menor contenido de vacuolas.

Sánchez y Moore (1999), reportaron un método que permite distinguir cuerpos fructíferos y la zona joven y madura de colonias de *P. pulmonarius* y *Coprinus cinereus*, mediante la tinción con colorantes específicos como azul de toluidina en ácido bórico al 1%, verde de Janus al 0.001% y reactivo de Feulgen (Gurr 1963), este

último fue empleado en el estudio del cariotipo de *Diplodon chilensis*. La función de este colorante en los hongos es romper la estructura de la pared celular debido al ácido clorhídrico que contiene, lo que permite la incorporación de la fuchina al interior de la hifa y de esta manera teñir el glicógeno existente en la célula. Por ello, las hifas jóvenes se teñirán de manera más rápida que las maduras. Se ha reportado que los hongos crecen por las puntas de las hifas, lo que representa la zona más activa y joven de la colonia (Barnicki-García y cols. 1972). Sánchez y cols. (2004) encontraron que la diferencia estructural de las hifas jóvenes y maduras de *P. pulmonarius* estaba relacionada con el grosor de la pared celular y el contenido del material citoplasmático. Sánchez (1998) reportado que la pared de las hifas madura de *P. pulmonarius* tienen un grosor de 0.151 μm y las hifas jóvenes de 0.073 μm . La pared celular de las hifas está compuesta principalmente por glucanos, quitina y glicoproteínas (Pontón 2008).

Por otra parte, Téllez-Téllez (2002), reportó que la presencia de una membrana de celofán sobre el agar donde se desarrolló la cepa de *Pleurotus pulmonarius* PPL27, actuó como inductor de algunas actividades enzimáticas intracelulares, entre ellas, quitinasas y endocelulasas, además favoreció el desarrollo de cuerpos fructíferos y produjo un incremento en la densidad micelial en comparación con lo observado en colonias desarrolladas sin celofán.

Por otra parte, estudios realizados sobre *Schizophyllum commune* indican que la pared celular de este organismo está compuesta principalmente por glucanos y una parte de quitina. El S-glucano es localizado en el exterior de la superficie de la pared como una capa microcristalina y tiene una estructura de poliglucosa con enlaces α (1-3) y el R-glucano presentó enlaces β (1-3) y β (1-6), este glucano es insoluble debido a que presentó enlaces covalentes con quitina formando un complejo estructural de la pared celular (Sietsma y Wessels 1977).

Gooday (1972) y Craig y cols. (1981), reportaron que en la pared celular de *Coprinus cinereus* y *A. bisporus* la síntesis de quitina, es primordial para la elongación de la pared de la hifa del estípote. La N-acetilglucosamina precursor de la quitina se va incorporando en la elongación de las hifas del cuerpo fructífero durante su expansión y la actividad de la quitin-sintetasa se incrementa durante la expansión del estípote y del cuerpo fructífero y decrece al finalizar el periodo de elongación. Por otra parte, Mol y Wessels (1990),

compararon la ultra estructura de la pared de la hifa del micelio y de las hifas del estípite del cuerpo fructífero de *A. bisporus*, reportan que en la elongación de la hifa del estípite las cadenas de quitina están orientadas transversalmente y generalmente no están organizadas en diferentes microfibrillas de quitina, mientras que en las hifas del micelio las microfibrillas están orientadas al azar embebidas en una matriz amorfa. También mencionan que la composición química de la pared celular del micelio y de las hifas del estípite es similar, pero que los polímeros de la hifa en elongación del estípite son más susceptibles a la degradación enzimática.

La producción de lacasas está asociada con la pigmentación de los conidios de *Aspergillus nidulans* y en *Coprinus cinereus*, las fenoloxidasas son las responsables de la pigmentación oscura de las basidiosporas (Vnenchak y Schwalb 1989). Szklarz y cols. (1989), reportaron que las lacasas y peroxidasas, junto con otras enzimas de hongos (glucosa oxidasa y/o celulasas) participan en la degradación de la lignina. En *Agaricus bisporus*, la función de las enzimas secretadas principalmente son hidrolasas y oxidasas, y la actividad de lacasas y celulasas es regulada fuertemente durante el desarrollo del cuerpo fructífero, parece que la regulación de la actividad se acopla con el programa de la morfogénesis del cuerpo fructífero. Se ha reportado que la concentración de lacasas en este hongo aumenta durante el desarrollo vegetativo y disminuye al iniciar la fructificación, mientras que la actividad de celulasas puede detectarse durante todo el desarrollo y aumentar durante la fructificación (Ohga y cols. 1999).

Por otra parte las proteasas son esenciales para el abastecimiento de aminoácidos, para la activación de zimógenos de la pared celular para eliminar las proteínas innecesarias o indeseables y para la hidrólisis de los componentes de la pared celular, que afectan la morfogénesis de los hongos entre otras cosas (Deshpande 1992).

Buswell y cols. (1996), reportaron que *Pleurotus sajor-caju*, fue desarrollado en un cultivo sumergido con celulosa cristalina como fuente de carbono, la actividad de endoglucanasas extracelulares y exoglucanasas fueron las más representativas, sin embargo también encontraron celulasas y lacasas.

Existen pocos estudios sobre aspectos morfogenéticos del cuerpo fructífero en hongos, la mayoría se han realizado sobre desarrollo del cuerpo fructífero de *Coprinus cinereus*

empleando técnicas microscópicas así como procesamiento de imágenes. Sánchez y cols. (2004), evaluaron el contenido de proteína, glucanos, lacasas, proteasas y glucanasas en la parte vegetativa de una cepa de *P. pulmonarius*. También se han realizado estudios sobre el desarrollo del cuerpo fructífero de *Schizophyllum commune* (Wessels 1994, Wessels 1993). Sin embargo, solo existe un estudio en el cual se empleó microscopia de luz y electrónica en el desarrollo del cuerpo fructífero de *P. pulmonarius*, (Sánchez 2004, Sánchez y cols. 2006).

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles serán las diferencias en la ultraestructura celular, actividad enzimática y contenido de glicógeno que presentaran las hifas de la fase vegetativa y del cuerpo fructífero de *P. ostreatus*?

4. JUSTIFICACIÓN

Existe un solo estudio en el que se reporta algunas de las propiedades bioquímicas y ultraestructurales de la zona joven y madura de la colonia de una cepa de *P. pulmonarius*, así como algunas características ultraestructurales del desarrollo del cuerpo fructífero de *P. pulmonarius*. Por lo anterior, en esta investigación se estudiarán las características bioquímicas y morfológicas, así como la fructificación y desarrollo del cuerpo fructífero, con el objeto de conocer aspectos morfogenéticos básicos de la fructificación y desarrollo del cuerpo fructífero de este hongo.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la ultraestructura y las propiedades bioquímicas de las hifas de la zona joven y madura y de las diferentes etapas presentes en el desarrollo del cuerpo fructífero de *P. ostreatus*.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la ultraestructura de las hifas jóvenes y maduras en una colonia de *P. ostreatus*, así como en la base, estípite y píleo de 4 diferentes etapas (0.5, 1, 2, 4 mm) de crecimiento del cuerpo fructífero de este hongo.
- Evaluar el contenido de lacasas, proteasas, quitinasas, glucanasas, celulasas glicógeno y glucanos solubles e insolubles en las hifas jóvenes y maduras en una colonia de *P. ostreatus*.
- Evaluar el contenido de lacasas, proteasas, quitinasas, glucanasas, celulasas glicógeno y glucanos solubles e insolubles en cuatro diferentes etapas (0.5, 1, 2, 4 mm) de fructificación de *P. ostreatus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. ORGANISMO Y REACTIVACIÓN DE LA CEPAS.

Se utilizó la cepa *Pleurotus ostreatus* 50, de la colección del colegio de posgraduados, Puebla (COLPOS). Se reactivó en un medio de cultivo sólido de agar extracto de malta (EMA) y se inoculó con un fragmento de micelio de 4 mm de diámetro y se incubó por 7 días a 25°C en oscuridad.

6.2. OBTENCIÓN DE LOS CUERPOS FRUCTÍFEROS Y FASE VEGETATIVA DE *P. ostreatus*

La fructificación de las colonias de *P. ostreatus* se realizó en cristalizadores conteniendo agar papa dextrosa (PDA) y fueron inoculados con un fragmento de micelio de 4 mm (desarrollado en EMA) y se incubó por 12 días a 28°C con un ciclo de 16 h luz y 8 h obscuridad. Se cosecharon los cuerpos fructíferos (CF) en diferentes etapas de desarrollo, las que correspondieron a 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mm de longitud. Por otro lado la fase vegetativa o micelial de este organismo fue estudiada en cajas Petri conteniendo (PDA) que fueron inoculadas de manera similar a los cristalizadores e incubadas a 28 °C. Estudiando la zona madura (zona central de la colonia) y la zona joven (periferia)

6.3. ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LAS FASES DE DESARROLLO DEL CUERPO FRUCTÍFERO Y LA FASE VEGETATIVA DE *P. ostreatus* EMPLEANDO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se tomaron muestra de las dos diferentes zonas de desarrollo y de los CF de 0.5, 1, 2, 4 mm, se colocaron en tubos Eppendorf con glutaraldehído al 3% después de 24 h se enjuagaron las muestras cinco veces cada 20 minutos con buffer de fosfatos pH 7.2, después se le agregó tetróxido de osmio durante 2 h, después se lavaron las muestras con acetona del 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% (cada 10 minutos), 100% (cada 15 minutos). Posteriormente se vertieron en una resina (50% Epon, 50% acetona) por 24 h en el desecador. A las 24 h se le retiró el exceso de Epon, se seleccionaron las mejores muestras y se colocaron en moldes con Epon al 100% durante 48 h, posteriormente se realizaron cortes (40 nm) con el micrótopo para ser analizados con el microscopio electrónico de transmisión JEOL (JEN-1200EX II).

6.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA ZONA JOVEN Y MADURA DE LA FASE VEGETATIVA Y DEL CUERPO FRUCTÍFERO

6.4.1. ANÁLISIS ENZIMÁTICO DE LAS COLONIAS DE *P. ostreatus*

Para el análisis enzimático del micelio de la fase vegetativa (zona joven y madura) y de las diferentes etapas del CF de *P. ostreatus*, se obtuvo el extracto crudo enzimático (ECE) por lisis celular (empleando un macerador de tejidos PIREX). En un tubo Eppendorf con volumen de agua conocido, el macerado se centrifugó a 15 000 rpm por 10 min a una temperatura de -2 °C; las paredes celulares del hongo se sedimentaron y se consideró al sobrenadante como el ECE.

6.4.2. DETERMINACIÓN DE LACASAS INTRACELULARES

La actividad de lacasas se cuantificó utilizando como sustrato 2,6-dimetoxifenol (Sigma) 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.0. La mezcla de reacción (475 µl de sustrato y 50 µl de ECE) se incubó a 39 °C por 15 min. Se leyó la absorbencia a 468 nm. Una unidad de actividad de lacasas es la cantidad de enzima que provoca incrementos de 1.0 unidad en la absorbencia por min. de incubación (Ardon y cols 1998).

6.4.3. DETERMINACIÓN DE PROTEASAS INTRACELULARES

La actividad de proteasas se determinó por la cuantificación de aminoácidos aromáticos liberados en la mezcla de reacción (450 μ l caseína al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.0 y 50 μ l de ECE), incubada a 35 °C por 15 min, la reacción se detuvo por la adición de 750 μ l de ácido tricloracético (Baker) al 5%. La mezcla se centrifugó a 15 000 rpm por 15 min a temperatura de refrigeración. Se leyó la absorbencia del sobrenadante a 280 nm, una unidad de actividad de proteasa fue la unidad de enzima que libera aminoácidos aromáticos provocando un cambio de 1.0 unidad en la absorbencia por min de incubación (Kunitz 1947).

6.4.4. DETERMINACIÓN DE GLUCANASAS INTRACELULARES

La actividad de glucanasas se cuantificó evaluando el incremento de azúcares reductores liberados en la mezcla de reacción (500 μ l laminarina (Sigma) al 0.7 %, 450 μ l de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.0 y 50 μ l de ECE) incubada a 30 °C por 90 min, la reacción se detuvo por la adición de 2 ml de DNS. Se leyó la absorbencia a 575 nm (Sharma y Nakas 1987). Una unidad de actividad de glucanasas, fue la unidad de enzima que libera 1 μ M de producto por min. Se preparó una curva de calibración con glucosa.

6.4.5. DETERMINACIÓN DE ENDOCELULASAS INTRACELULARES

La actividad de endocelulasas se cuantificó evaluando el incremento de los azúcares reductores (Miller, 1959) liberados en la mezcla de reacción (500 μ l carboximetilcelulasa (SIGMA) al 0.6% en buffer de acetatos 0.1M y pH de 5.0, 50 μ l de ECE y 450 μ l de buffer de acetatos), incubada a 35°C por 120 min, la reacción se detuvo por la adición de 2 ml de DNS. Se leyó la absorbencia a 575 nm (Buswell y col. 1996). Una unidad de actividad de endocelulasas es la cantidad de enzima que libera 1 μ M de producto por min. Se preparó una curva de calibración con glucosa.

6.4.6. DETERMINACIÓN DE QUITINASAS INTRACELULARES

La actividad de quitinasas se cuantificó evaluando la concentración de NAG liberada en la mezcla de reacción (900 µl de quitina (Sigma) al 1% en buffer de acetatos 0.1 M pH de 5 y 100 µl de ECE) incubada a 37 °C por 4.5 h, la reacción se detuvo por la adición de 870 µl de ρ -dimetilaminobenzaldehído (DMAB) (10:01 v/v de 0.67 M de DMAB en ácido acético glacial y 10 M de HCl) y se incubó nuevamente por 20 min, se leyó la absorbancia a 585 nm (Coudron y col. 1984). Una unidad de actividad de quitinasas fue la cantidad de enzima que libera 1 µM de producto por min. Se preparó una curva de calibración con NGA (SIGMA).

6.4.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLICÓGENO INTRACELULAR

Para determinar la cantidad de glicógeno se hizo una extracción acuosa y otra alcohólica (96%) del micelio macerado de las diferentes zonas. Se determinó el contenido de azúcares totales por el método de antrona (Trevelyn y Harrison 1952). A 100 µl de la dilución 1:200 del ECE se le agregó 2 ml del reactivo de Antrona (Sigma). Se calentó a temperatura de ebullición por 10 min. y después de enfriarse se leyó la absorbancia a 625 nm, se preparó una curva de calibración con glucosa. También se cuantificó la cantidad de azúcares reductores por medio del reactivo DNS (ácido dinitro-salícilico), a 100 µl de ECE y 900 µl de agua destilada se le agregó 2 ml del reactivo DNS. Se calentó a una temperatura de ebullición por 5 min y después de enfriarse se leyó la absorbancia a 575 nm, el contenido de glicógeno se calculó como la diferencia entre el contenido de azúcares totales menos el de los azúcares reductores.

6.4.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCANOS DE LA PARED CELULAR

Los glucanos de la pared del hongo se prepararon en dos diferentes fracciones: soluble e insoluble en álcali. Los glucanos solubles en álcali se prepararon al solubilizar las paredes celulares en hidróxido de potasio (KOH) 1N, por 18 h a 25 °C. Se centrifugó a 15 000 rpm por 3 min a -2 °C. El precipitado (R-glucano) se solubilizó con ácido fórmico concentrado caliente y se cuantificó por el método de Antrona. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 5 con ácido acético (Sigma) y se centrifugó, el precipitado (S-

glucano) se solubilizó con KOH 1N y se cuantificó por el método de Antrona (Wessels 1969).

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis de ultraestructura y bioquímicos se realizaron por triplicado empleando la prueba de t de Student para la fase vegetativa y ONE-WAY ANOVA del paquete estadístico IBM SPSS Statistics 19.

7. RESULTADOS

7.1. ULTRAESTRUCTURA DEL MICELIO VEGETATIVO Y DE LAS FASES DE DESARROLLO DEL CUERPO FRUCTÍFERO DE *P. ostreatus*

7.1.1. ZONA JOVEN Y MADURA DE LA FASE VEGATATIVA

En este estudio se encontró que las hifas de la fase vegetativa en la zona joven (Fig. 5 a) presentaron un diámetro de 2.081 μm con un grosor de pared celular de 0.396 μm , la mayoría de las hifas presentes en esta zona se observaron con una orientación de forma horizontal y algunas de forma longitudinal con presencia de un gran contenido de glicógeno (Fig. 6a). En la zona madura (Fig. 5b) el diámetro de la hifa es de 2.255 μm con un grosor de pared celular de 0.506 μm , la mayoría de las hifas presentes en esta zona se observan con una orientación horizontal y longitudinal, con poco contenido de glicógeno (Fig. 6b). Por lo anterior se encontró diferencias significativas ($p < 0.001$) en el diámetro de hifa entre la zona joven y madura (Fig. 3) y en el grosor de la pared celular entre las hifas de estas dos zonas (Fig. 4).

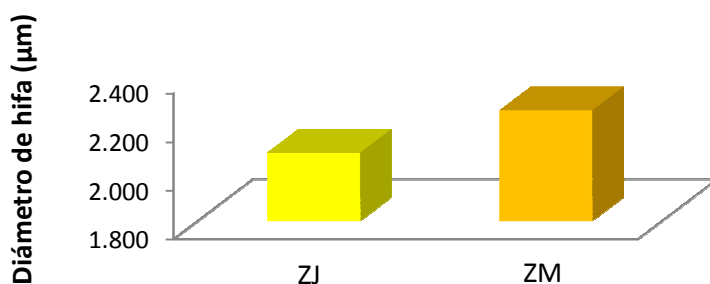


Fig. 3. Diámetro de hifa (μm) entre la zona joven ● y zona madura ●

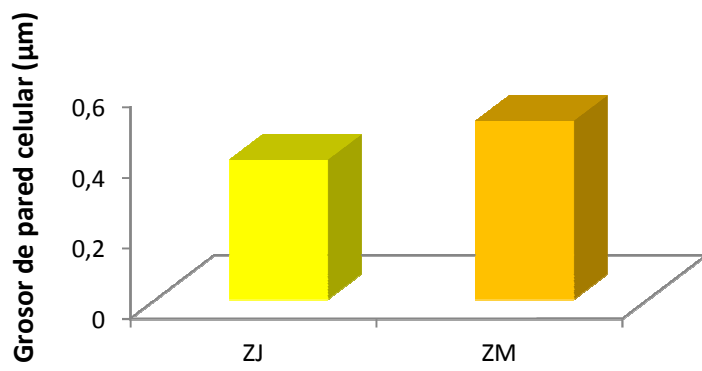
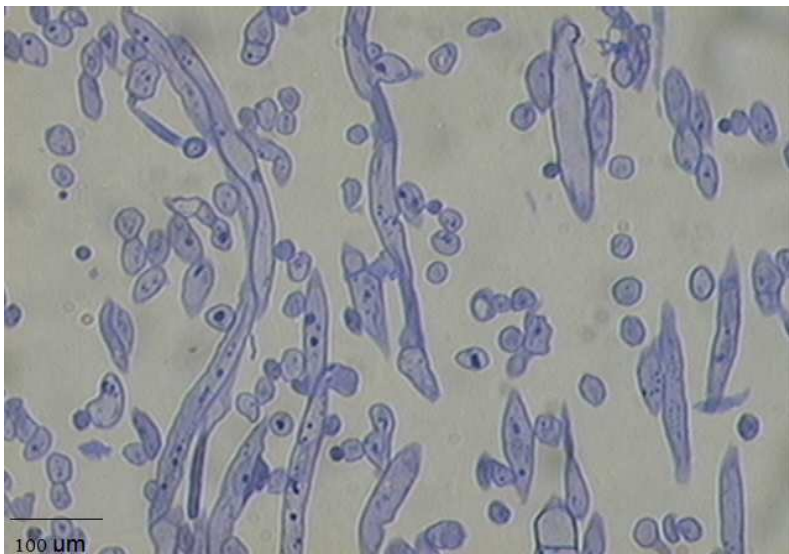


Fig. 4. Grosor de pared celular (μm) de la hifa entre la zona joven ● y zona madura ●

a)



b)

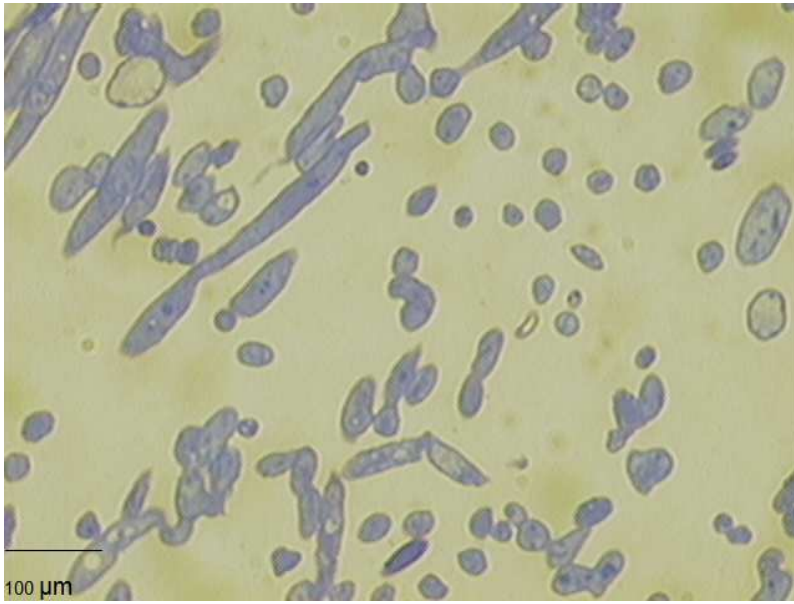
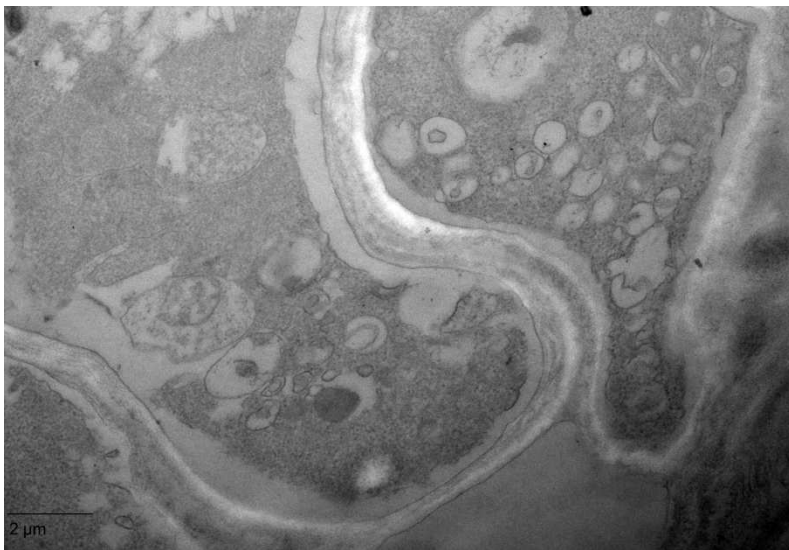


Fig. 5. Hifas de la zona joven (a) y madura (b) de la fase vegetativa del hongo *P. ostreatus* empleando microscopía electrónica de transmisión. Escala = 100 μm.

a)



b)

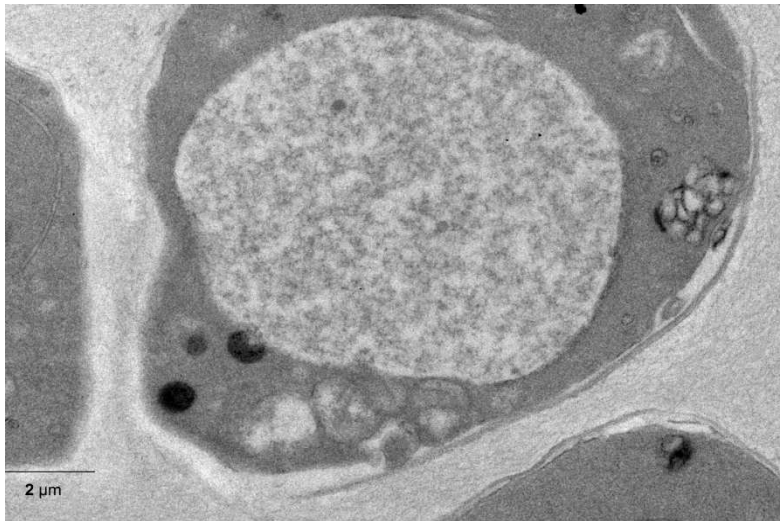


Fig. 6. Hifas de la zona joven (c) y madura (d) de la fase vegetativa del hongo *P. ostreatus* empleando microscopía electrónica de transmisión. Escala = 2 μm .

7.2. ETAPAS DE DESARROLLO DE LA FASE FRUCTÍFERA

7.2.1. CUERPO FRUCTÍFERO DE 0.5 mm

En este estudio se encontró que las hifas de la base (Fig. 9a) del cuerpo fructífero de 0.5 mm presentaron un diámetro de hifa de 2.602 μm con un grosor de pared celular de 0.511 μm , las hifas presentes en la base del cuerpo fructífero se observaron con una mayor distribución entre ellas, las cuales se encontraron en una posición longitudinal y horizontal con presencia de abundante contenido de glicógeno. Las hifas que dan la formación al estípite (Fig. 9b) presentaron un diámetro de hifa de 2.458 μm con un grosor de pared celular de 0.375, estas hifas se observaron de manera más conjunta en una posición longitudinal y horizontal con presencia de glicógeno (Fig. 10). Por lo anterior se encontró diferencias significativas ($p < 0.001$) en el diámetro de hifa (Fig. 7) y grosor de la pared celular del hongo de 0.5 mm entre la base y estípite (Fig. 8).

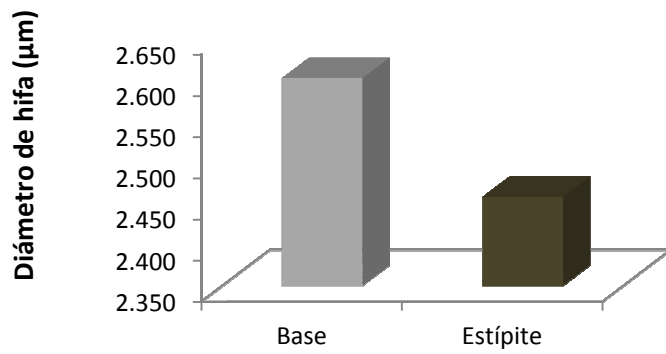


Fig. 7. Diámetro de la hifa (μm) del hongo de 0.5 mm entre la base \circ y estípite \bullet

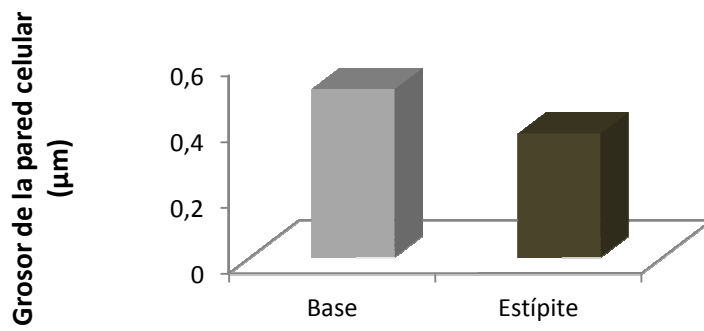
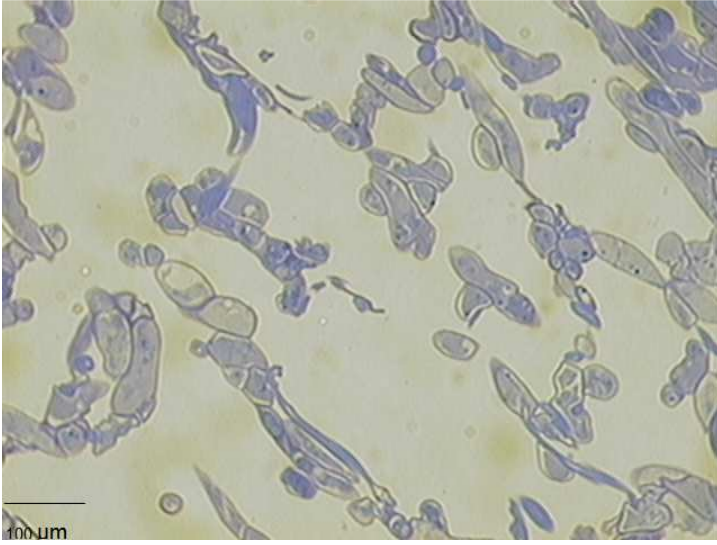


Fig. 8. Grosor de la pared celular en la hifa (μm) del hongo de 0.5 mm entre la base \circ y estípite \bullet

a)



b)

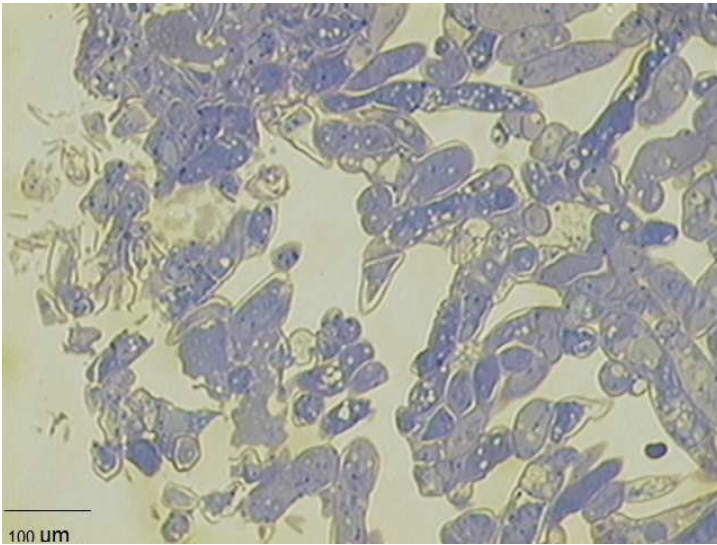


Fig. 9. Hifas de la base (a) y estípite (b) del cuerpo fructífero de 0.5 mm de *P. ostreatus* empleando microscopía electrónica de transmisión. Escala = 100 μm.

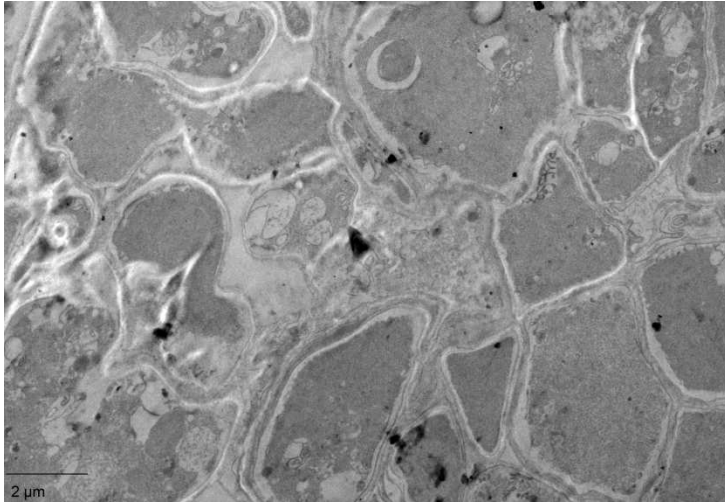


Fig. 10. Hifas del estípite del cuerpo fructífero de 0.5 mm de *P. ostreatus* empleando microscopía electrónica de transmisión. Escala = 2 μ m.

7.2.2. CUERPO FRUCTIFERO DE 1 mm

Las hifas de la base (Fig. 13a) del cuerpo fructífero de 1 mm presentaron un diámetro de hifa de 2.011 μ m con un grosor de pared celular de 0.436 μ m, estas hifas presentes en la base del cuerpo fructífero se observaron con una mayor distribución entre ellas, las cuales se encontraron en una posición longitudinal y vertical con presencia de abundante cantidad de glicógeno. Las hifas del estípite (Fig. 13b) presentaron un diámetro de hifa de 2.036 μ m con un grosor de pared celular de 0.421 μ m, estas hifas se observaron en una posición horizontal y longitudinal con presencia de abundante cantidad de glicógeno (Fig. 14). Para las hifas de la formación del píleo, (Fig. 13c) se observó que se encuentran con una mayor distancia entre ellas con una posición horizontal, con un diámetro de hifa de 2.017 μ m y un grosor de pared celular de 0.451 μ m, con presencia de abundante cantidad de glicógeno. Por lo anterior se encontró diferencias significativas ($p < 0.001$) en el diámetro de hifa (Fig. 11) y grosor de la pared celular del hongo de 1 mm entre la base, estípite y píleo (Fig. 12).

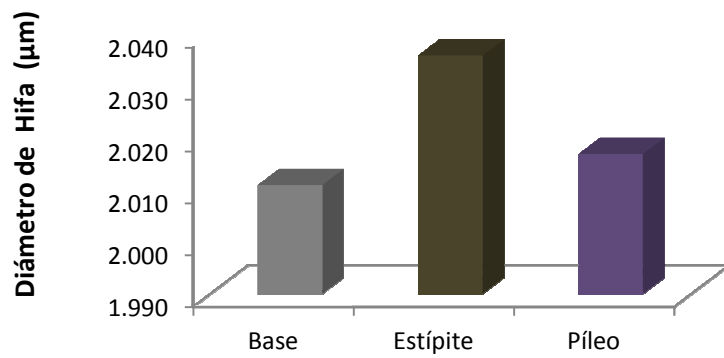


Fig. 11. Diámetro de la hifa (μm) del hongo de 1 mm entre la base ○, estípite ● y píleo ●

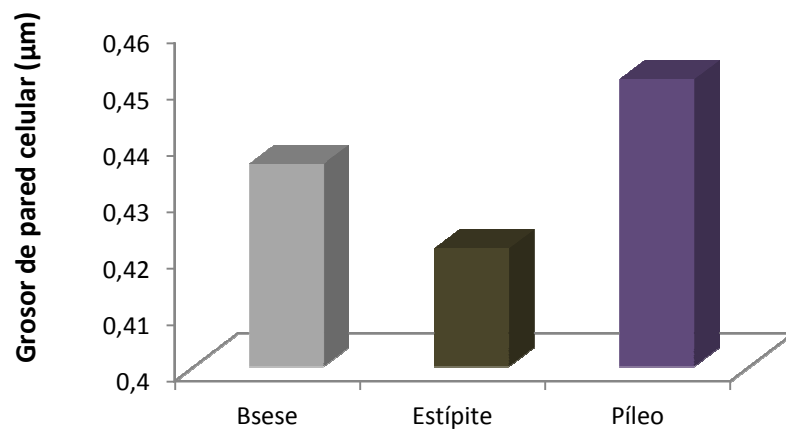
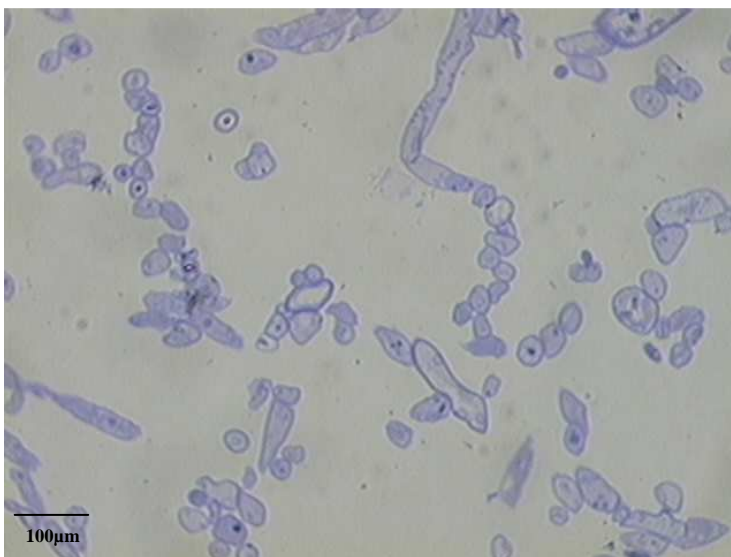


Fig. 12. Grosor de la pared celular (μm) en las hifas del hongo de 1 mm entre la base ○, estípite ● y píleo ●

a)



b)



b)

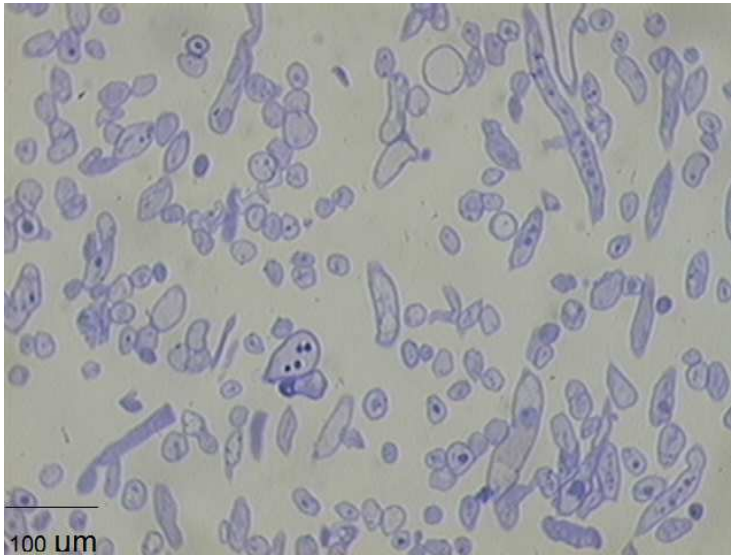


Fig. 13. Hifas de la base (a), estípite (b) y píleo (b) del cuerpo fructífero de 1 mm de *P. ostreatus*, empleando microscopía electrónica de transmisión. Escala = 100 μm .

a)

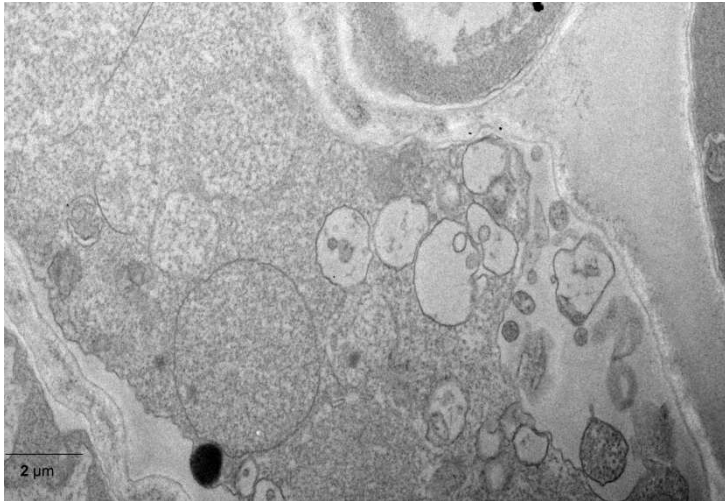


Fig. 14. Hifa del estípite del cuerpo fructífero de 1 mm de *P. ostreatus* empleando microscopía electrónica de transmisión. Escala = 2 μm .

7.2.3. CUERPO FRUCTÍFERO DE 2 mm

Las hifas de la base (Fig. 17a) del cuerpo fructífero de 2 mm presentaron un diámetro de hifa de 4.276 μm con un grosor de pared celular de 0.532 μm , las hifas presentes en la base del cuerpo fructífero se observaron con una menor distribución entre ellas, las cuales se encontraron en una posición longitudinal y horizontal con presencia de poco contenido de glicógeno. Las hifas del estípite (Fig. 17b) presentaron un diámetro de hifa de 3.908 μm con un grosor de pared celular de 0.461 μm , estas hifas se observaron con una menor distancia entre ellas, la mayoría en posición longitudinal con presencia de poca cantidad de glicógeno (Fig. 18). Para las hifas del píleo (Fig. 17c), se observó que se encuentran con una mayor distancia entre ellas con una posición horizontal, con un diámetro de hifa de 3.336 μm y un grosor de pared celular de 0.425 μm , con presencia de poca cantidad de glicógeno. Por lo anterior se encontró diferencias significativas ($p < 0.001$) en el diámetro de hifa (Fig. 15) y grosor de la pared celular del hongo de 2 mm entre la base, estípite y píleo (Fig. 16).

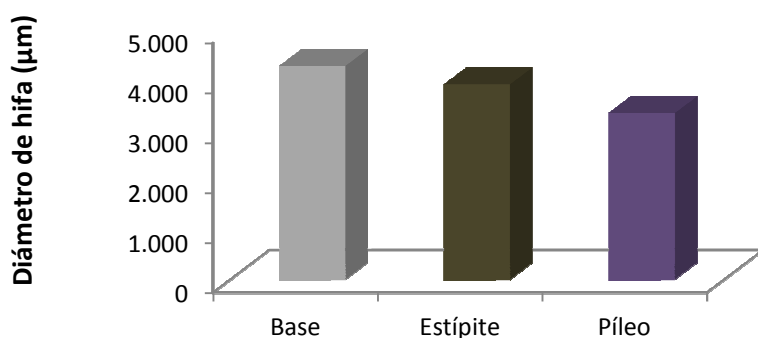


Fig. 15. Diámetro de la hifa (μm) del hongo de 2 mm entre la base \odot , estípite \bullet y píleo \bullet

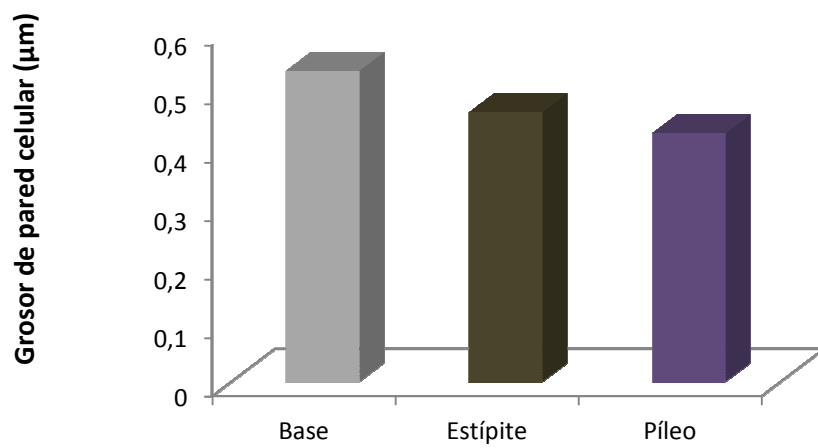
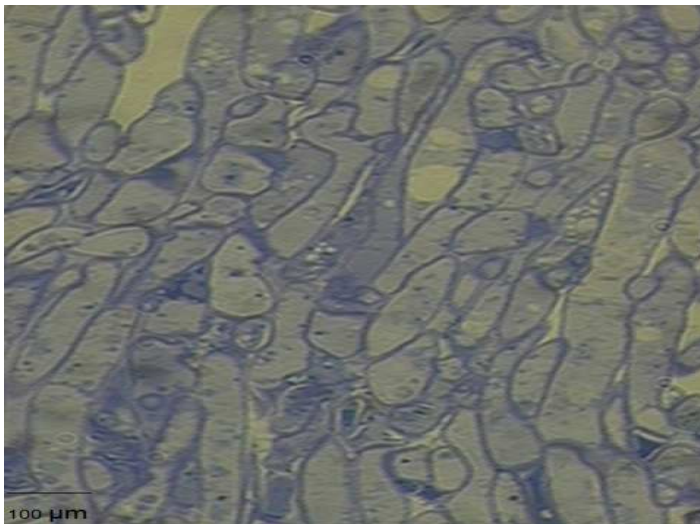
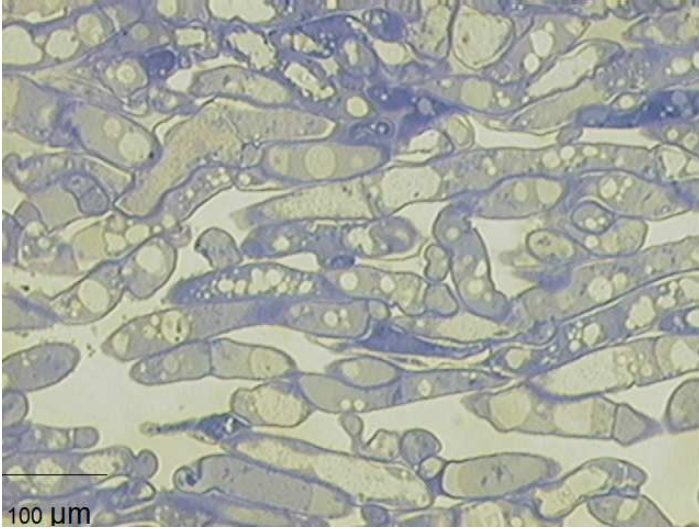


Fig. 16. Grosor de la pared celular en las hifas (μm) del hongo de 2 mm entre la base \circ , estípite \bullet y píleo \bullet .

a)



b)



c)

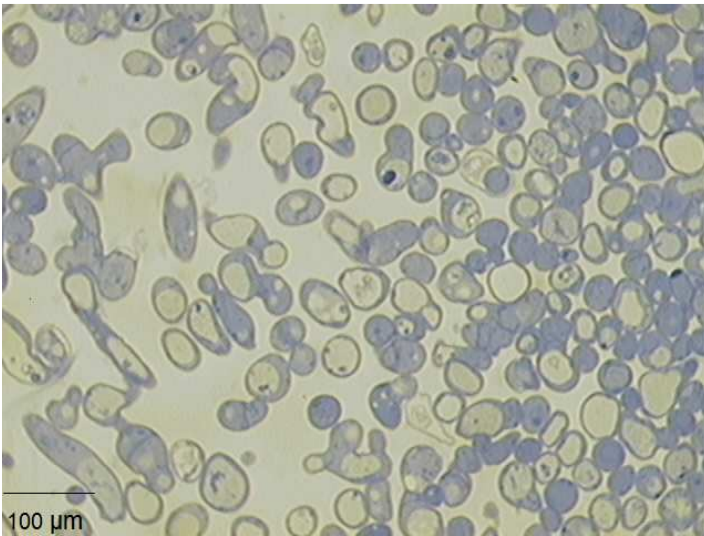


Fig. 17. Hifas de la base (a), estúpite (b) y píleo (c) del cuerpo fructífero de 2 mm de *P. ostreatus* empleando microscopia electrónica de transmisión. Escala = 100 μm.

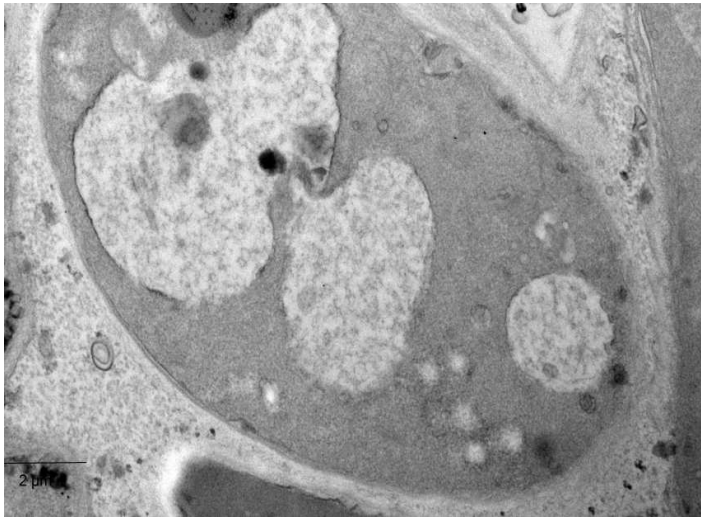


Fig. 18. Hifas del estípite del cuerpo fructífero de 2 mm de *P. ostreatus* empleando microscopia electrónica de transmisión. Escala = 2 μm .

7.2.4. CUERPO FRUCTIFERO DE 4 mm

Las hifas de la base (Fig. 21a) del cuerpo fructífero de 4 mm presentaron un diámetro de hifa de 4.569 μm con un grosor de pared celular de 0.423 μm , las hifas presentes en el cuerpo fructífero se observan con una mayor distribución entre ellas, las cuales se encuentran en una posición longitudinal y horizontal con presencia de muy poca cantidad de glicógeno. Las hifas del estípite (Fig. 21b) presentaron un diámetro de hifa de 3.965 μm con un grosor de pared celular de 0.471 μm , estas hifas se observaron con una mayor distancia entre ellas con una posición longitudinal y horizontal, con presencia de poca cantidad de glicógeno (Fig. 22). Para las hifas del píleo (Fig. 21c), se observó que se encuentran con una menor distancia entre ellas con una posición horizontal, con un diámetro de hifa de 4.286 μm y un grosor de pared celular de 0.486 μm , con presencia de poca cantidad de glicógeno. Por lo anterior se encontró diferencias significativas ($p < 0.001$) en el diámetro de hifa (Fig. 19) y grosor de la pared celular del hongo de 4 mm entre la base, estípite y píleo (Fig. 20).

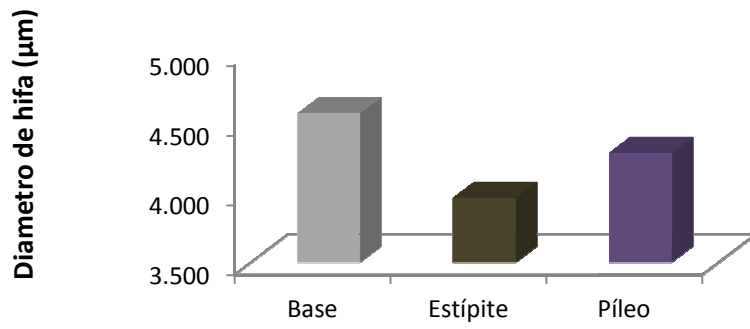


Fig. 19 Diámetro de la hifa (μm) del hongo de 4 mm entre la base \odot , estípite \bullet y píleo \bullet

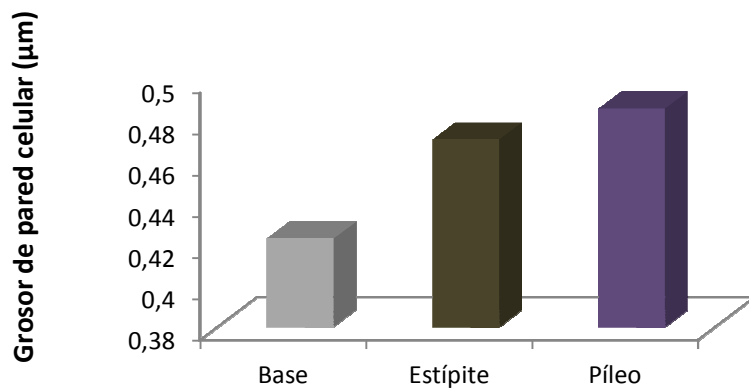
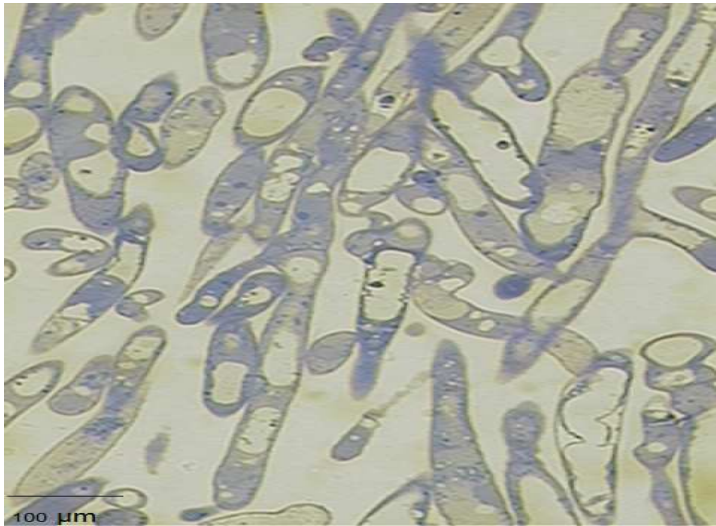


Fig. 20. Grosor de la pared celular (μm) en las hifas del hongo de 4 mm entre la base \odot , estípite \bullet y píleo \bullet .

a)



b)



c)

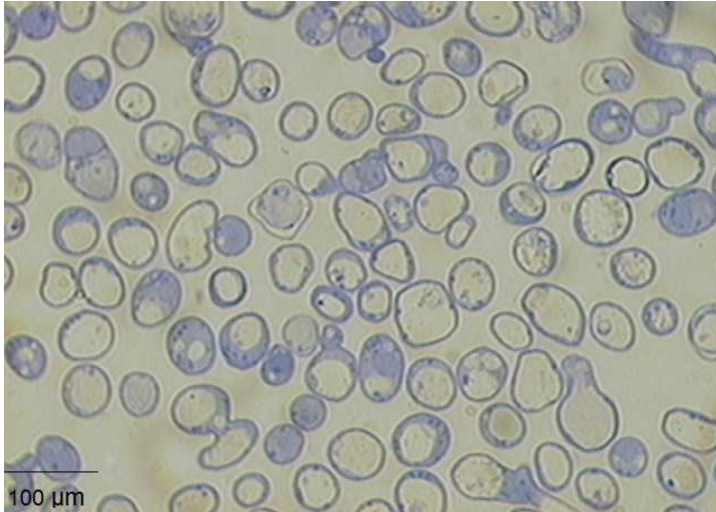


Fig. 21. Hifas de la base (a), estípite (b) y píleo (c) del cuerpo fructífero de 4 mm de *P. ostreatus* empleando microscopía electrónica de transmisión. Escala = 100 μm .

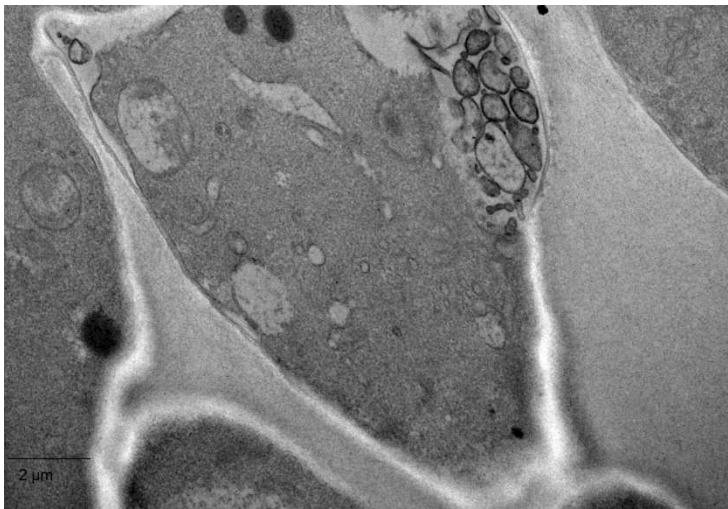


Fig. 22. Hifa del estípite del cuerpo fructífero de 4 mm de *P. ostreatus* empleando microscopía electrónica de transmisión. Escala = 100 μm .

7.3. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

En relación a las propiedades bioquímicas se encontró mayor actividad de lacasas (Fig. 23) en la fase vegetativa (ZJ 17.645 U/g, ZM 16.108 U/g) con respecto a la fase fructífera (CF de 0.5 mm 0.830 U/g X, 1 mm 5.577 U/g, 2 mm 4.754 U/g y 4 mm 4.619 U/g). Para proteasas (Fig. 24) se encontró mayor actividad en la fase vegetativa especialmente en la ZM (7.018 U/g) en comparación con la fase fructífera que sólo se obtuvo actividad en el CF de 4 mm (1.911 U/g) y 1 mm (1.135 U/g). Por otro lado, el CF de 0.5 mm presentó mayor actividad de glucanasas (Fig. 25) (0.830 U/g) con respecto a la ZJ (0.366 U/g) y ZM (0.489 U/g). En cuanto a la actividad de endocelulasas (Fig. 26), sólo se manifestó actividad en la ZM (0.443 U/g) y ZJ (0.126 U/g). Se encontró que el CF de 2 mm presentó mayor actividad de quitinasas (Fig. 27) (0.031 U/g) en comparación con la ZJ (0.008 U/g) y ZM (0.006 U/g) pero en menor proporción que el CF de 1 mm (0.039 U/g), CF de 0.5 mm (0.054 U/g) y CF 4 mm (0.132 U/g). Para el contenido de glicógeno (Fig. 28) Se observa que fue mayor en el CF de 0.5 mm (1.297 mg /g) con relación a las demás zonas de estudio (ZJ 0.981 mg/g, ZM 0.297 mg/g, CF de 1 mm 0.995 mg/g, CF de 2 mm 0.843 mg/g, CF de 4 mm 0.838 mg/g). Por último, el contenido de R-Glucanos (Fig. 29) fue mayor en la fase vegetativa y (ZJ 9.593 mg/g, ZM 2.406 mg/g) en comparación con la cantidad obtenida de S-Glucanos (Fig. 29) que fue mayor en la fase fructífera (CF de 1 mm 1.146 mg/g, CF de 2 mm 0.542 mg/g y CF de 4 mm 14.856 mg/g) en cada una de las zonas estudiadas.



Fig.23. Actividad enzimática de lacasas en la ZJ (●), ZM (●), CF 0.5 mm (●), CF 1 mm (●), CF 2 mm (●) y CF 4 mm (●) de *P. ostreatus*.

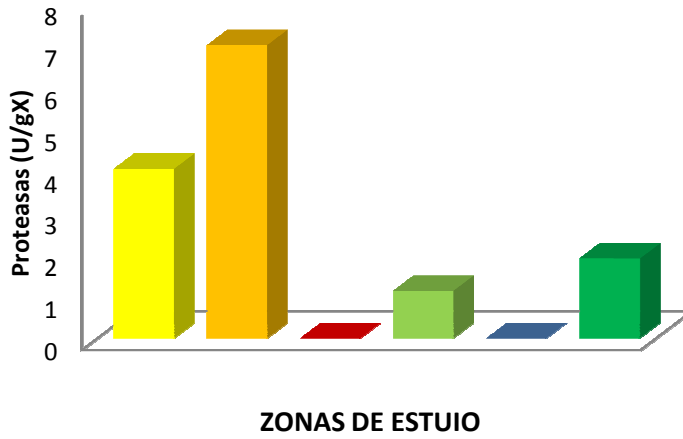


Fig. 24. Actividad enzimática de proteasas en la ZJ (●), ZM (●), CF 0.5 mm (●), CF 1 mm (●), CF 2 mm (●) y CF 4 mm (●) de *P. ostreatus*.

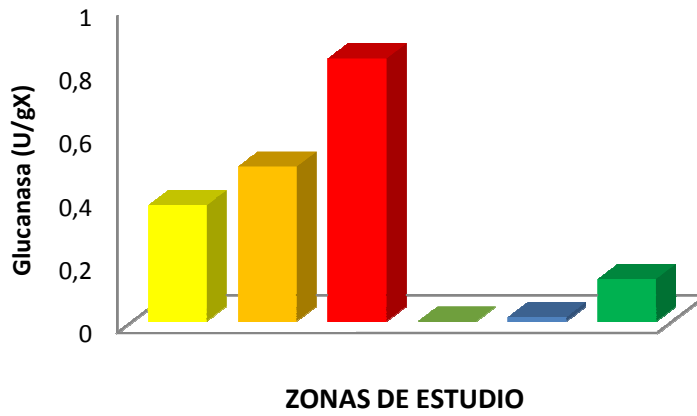


Fig. 25. Actividad enzimática de glucanasas en la ZJ (●), ZM (●), CF 0.5 mm (●), CF 1 mm (●), CF 2 mm (●) y CF 4 mm (●) de *P. ostreatus*.

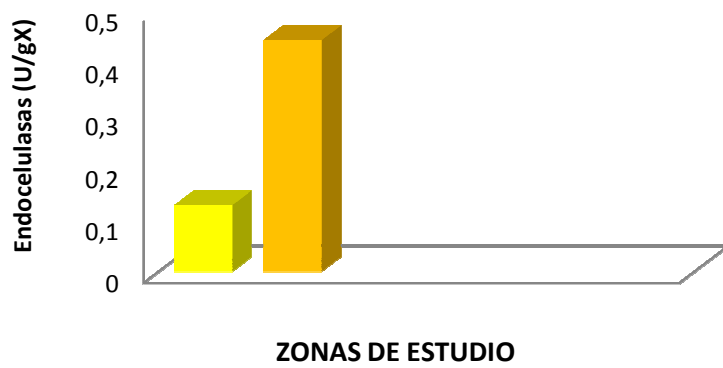


Fig. 26. Actividad enzimática de endocelulasas en la ZJ (●) y ZM (●) de *P. ostreatus*.

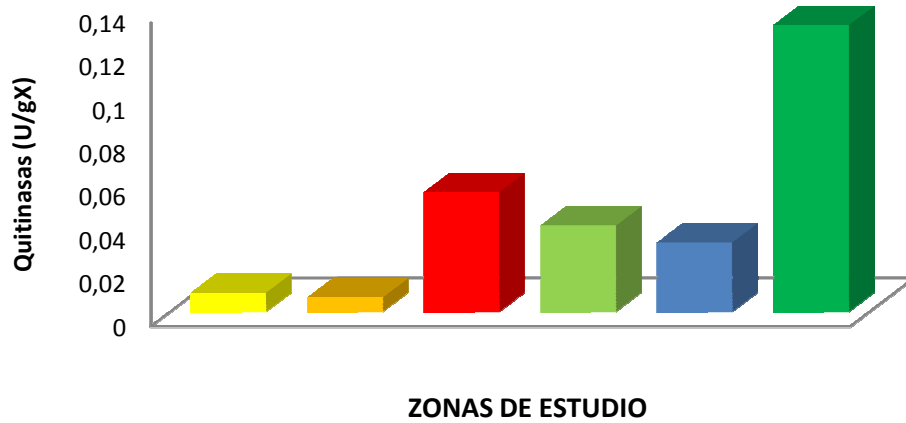


Fig. 27. Actividad enzimática de quitinasas en la ZJ (●), ZM (●), CF 0.5 mm (●), CF 1 mm (●), CF 2 mm (●) y CF 4 mm (●) de *P. ostreatus*.

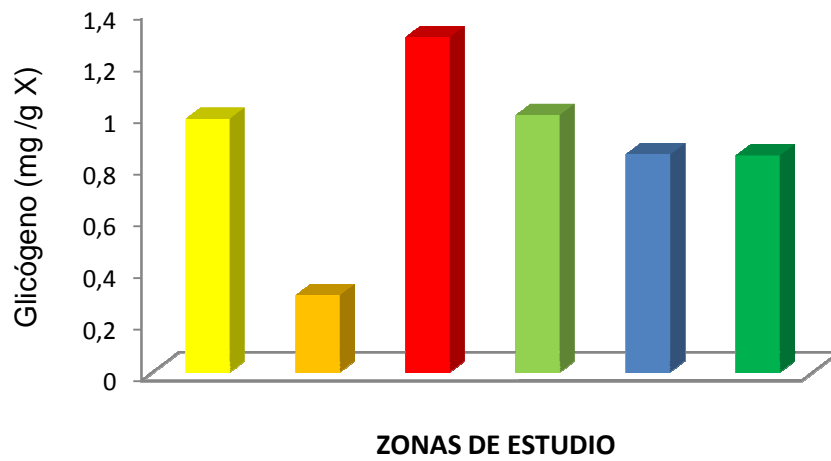


Fig. 28. Contenido de glicógeno intracelular en la ZJ (●), ZM (●), CF 0.5 mm (●), CF 1 mm (●), CF 2 mm (●) y CF 4 mm (●) de *P. ostreatus*.

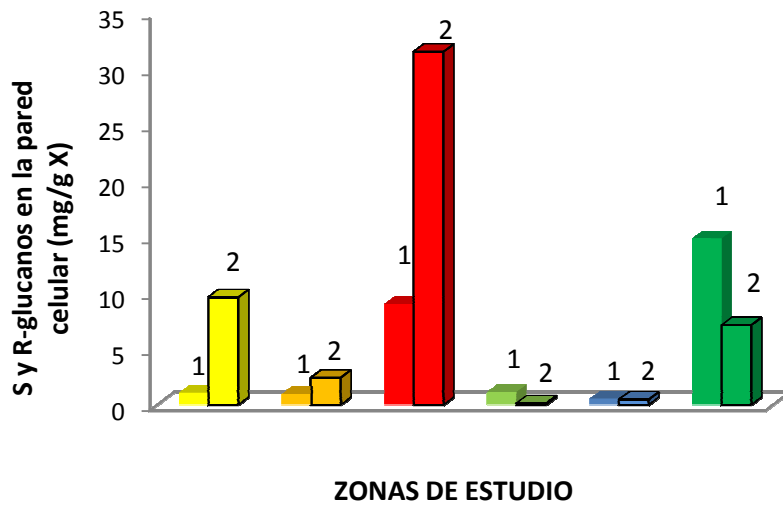


Fig. 29. Contenido de S (1) y R (2) glucanos en la pared celular de la ZJ (●), ZM (●), CF 0.5 mm (●), CF 1 mm (●), CF 2 mm (●) y CF 4 mm (●) de *P. ostreatus*.

8. DISCUSIÓN

Las técnicas de microscopia permiten determinar las características estructurales que presentan las células en diferentes condiciones de desarrollo. Particularmente, las técnicas de microscopia electrónica proporcionan información acerca de la cantidad de glicógeno presente, incluso Sánchez y col. (2004) reportaron que la diferencia entre los diferentes tipos de hifas (diferente edad celular, fase vegetativa y reproductiva) pueden determinarse en base a su capacidad para retener un colorante a través de una tinción. En estudios realizados en una colonia de *P. pulmonarius* que fue teñida con reactivo de Feulgen, se observó que no se tiñó la zona madura en la fase vegetativa y al observarla al microscopio electrónico presentó el doble en el grosor de la pared celular en relación a la zona joven.

Por lo anterior, en este trabajo se aplicó la técnica de tinción para poder diferenciar la ultraestructura celular (diámetro de hifa y grosor de la pared celular) empleando un microscopio electrónico de transmisión obteniendo que las hifas de la fase vegetativa se encuentran de manera horizontal y con presencia de material citoplasmático. Las hifas de la zona joven de la colonia se observaron en posición horizontal probablemente debido a que se ha observado que cuando los hongos crecen de una manera activa, presentan su desarrollo con las hifas en dirección hacia la periferia de la caja Petri. Para el cuerpo fructífero de 0.5 mm las hifas presentan una posición de manera longitudinal en comparación con las hifas que presenta la fase vegetativa que son de manera horizontal, los cuerpos fructíferos de 1, 2 y 4 mm presentan las hifas de manera longitudinal en la base y estípote, en el píleo las hifas vuelven a tomar la posición horizontal dando forma a este. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sánchez y col. (2004) en el hongo *P. pulmonarius*.

Por otro lado las enzimas son muy importantes en el desarrollo de los hongos ligninolíticos principalmente las lacasas que degradan sustratos lignocelulósicos. Estas tienen gran importancia en el crecimiento del hongo por ser las encargadas de la degradación del sustrato, principalmente lignina. Ohga y col. (1999) reportaron que la concentración de lacasas en *A. bisporus* se incremento paralelamente con la masa micelial durante la colonización del sustrato y disminuyo al iniciar la fructificación. En este trabajo de investigación se encontró mayor actividad de lacasas en la fase micelial, zona joven y zona madura con respecto a la fase fructífera lo que confirma los hallazgos

previamente reportados. Por otro lado, se encontró una mayor actividad de proteasas en la fase vegetativa principalmente en la zona madura. Deshpande (1992) reportó que las proteasas son esenciales para extraer las sustancias nitrogenadas resultando en una fracción del sustrato en forma de aminoácidos libres y el resto en forma de proteínas, la disminución de proteína en el sustrato esta correlacionada con el incremento en la actividad de proteasas. Evidentemente el incremento de proteasas permite que el hongo pueda degradar más proteína del sustrato y desviar la degradación de productos hacia la formación de los cuerpos fructíferos (tabla 2). En relación a las glucanasas el CF de 0.5 mm presentó la mayor actividad. Ramot y col. (2000) reportaron que las glucanasas tienen una función nutricional en particular, la movilización de β -glucanos cuando hay una fuente de carbono excesiva y un gasto de energía, además de su función fisiológica en el proceso morfogenético del hongo, lo que coincide con nuestro resultado. En cuanto a la actividad de endocelulasas, sólo se manifestó actividad en la fase vegetativa. Ohga y col. (1999) en un estudio sobre actividad enzimática de *A. bisporus* reportaron que las enzimas secretadas principalmente son hidrolasas y celulasas, y que la actividad de lacasas y celulasas es regularizada vigorosamente durante el desarrollo del cuerpo fructífero, lo que indicó que estas enzimas tienen un papel directamente nutricional. La regulación de la actividad enzimática se acopla con el programa de la morfogénesis del cuerpo fructífero, lo que demuestra que la máxima actividad de cada enzima depende del estado y de las condiciones de desarrollo de los hongos. En este trabajo se encontró que la mayor actividad de quitinasas se presentó en la fase fructífera, Mahadevan y Mahadkar (1970) reportan que las quitinasas son muy importantes para el debilitamiento de la pared celular y para la formación de primordios. Por otro lado, Gooday (1994) reportó que estas enzimas degradan la quitina a NGA(N-acetilglucosamina) lo que será necesario para la elongación de hifas, lo anterior esta de acuerdo con nuestros resultados, ya que la mayor cantidad de quitinasas se encontraron en la fase fructífera. Esta fase presentó mayor contenido de glicógeno en comparación con la fase vegetativa, Bourne y col. (1996) reportaron que es importante establecer la función principal del glicógeno con relación a que si es una reserva intracelular y es utilizado como un nutrimento o si es un carbohidrato que representa una correlación nutrición/desarrollo requerida para la fructificación. En la relación entre la concentración del contenido de glicógeno y la capacidad del desarrollo de los cuerpos fructíferos en *C. cinereus*, se concluyó que este carbohidrato no puede estar vinculado exclusivamente con los procesos de maduración del cuerpo fructífero. Aunque el

glicógeno acumulado en el píteo no es utilizado para un proceso posterior del desarrollo de éste. Siempre está disponible para ser utilizado (Ji y Moore, 1993). En la fase vegetativa y fructífera encontramos una mayor cantidad de S-glucanos en comparación con los R-glucanos, Se ha sugerido que la capa interna del S-Glucano está representada como una fina capa compuesta de glicoproteínas, es muy resistente a la digestión proteolítica. La capa interna de la pared, que es insoluble en álcali, representa la parte química más compleja de la pared celular. Está compuesta de microfibrillas de quitina embebidas en una matriz formada principalmente de R-glucanos pero también contiene hexosaminas y aminoácidos (Wessel 1978).

9. CONCLUSIONES

- En la zona joven y madura de la fase vegetativa se encontró diferencias entre el diámetro de hifa y grosor de pared celular debido al diferente estado de madurez que presenta.
- Con respecto a los cuerpos fructíferos se encontró diferencias entre el diámetro de hifa y grosor de pared celular debido a que presentan diferentes etapas de madurez.
- La fase vegetativa presentó la mayor actividad enzimática de lacasas, proteasas y celulasas, indicando que estas enzimas son fundamentales en el desarrollo del hongo.
- La fase fructífera presentó mayor cantidad de R-glucanos y S-glucanos que la fase vegetativa del hongo, lo que indica que la pared celular de la fase reproductiva es más compleja.
- El contenido de glicógeno fue mayor en la zona joven de la fase vegetativa y en el cuerpo fructífero de 0.5 mm de la fase fructífera lo que muestra la importancia de este compuesto, como reserva en el desarrollo del micelio y de los cuerpos fructíferos.
- Estos estudios son importantes en el conocimiento sobre el desarrollo de la fase micelial y morfogénesis del cuerpo fructífero de *P. ostreatus*.

10. PERSPECTIVAS

Realizar el estudio de ultraestructura para comparar el desarrollo fisiológico de esta cepa utilizando diferentes medios de cultivo como sustratos.

Realizar el estudio bioquímico para comparar la actividad enzimática presente en esta cepa utilizando diferentes medios de cultivo como sustratos.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory mycology. 4^a edición. Editorial John Wiley and sons. New York. pp. 869.

Badui D. 1994. Enzimas. Química de los Alimentos. Alambra Mexicana, México. pp 281-326.

Bano Z, Srinivasan KS, Srivastava DHC. 1963. Amino acid composition of the protein from a mushroom (*Pleurotus* spp) Applied Microbiology 11:184-187.

Bartnicki-Garcia S, Lippman E. (1972). The bursting tendency of hiphal tips of fungi: presumptive evidence for a delicate balance between wall synthesis and wall lyses in apical growth. Journal of General Microbiology 73: 487-500.

Baum BR y Bailey LG. 1987. A survey of endosperm starch granules in the genus *Hordeum*: a study using image analytic and numerical techniques. Canadian Journal Botánica1: 563-1569.

Baysal E, Peker H, Yalinkilic MK, Temiz A. 2003. Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. Bioresource Tech 89: 95-97.

Bonatti M, Karnopp P, Soares HM, Furlan SA. 2004. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. Food Chemistry 88: 425-428.

Bourne A, Chiu S, Moore D. 1996. Experimental approaches to the study of pattern formation in *Coprinus cinereus*. Patterns in fungal development (Ed. Sui-Wai C. y David M.). Cambridge University Press.Great Britain. pp 70-82

Buswell JA, Cai YJ, Chang S. 1996. Ligninolytic enzyme production and secretion inedible mushroom fungi. Mushroom Biology and Products Proceedings of Second international Conference (Ed. Daniel J. R.) pp 113-121. College of Agricultural Science, University Park Pennsylvania.

Cardona ULF. 2001. Revisión: Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Crónica forestal y del medio ambiente 16: 99-119.

Cohen R, Persky L, Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wooddegrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Applied Microbiol. and Biotech 8: 37-45.

Cole T, Pishko E, Seshan k. 1995. Possible roles of wall hydrolasas in the morphogenesis of *Coccidiodes immitis*. Canadian Journal Botanical 73: S1132-S1141.

Craig GD, Wood DA, Gull GW. 1981. Chitin synthase in the stipe of *Agaricus bisporus* (I. Lange) Imbach. FEMS Microbiology Letters 10: 43-47.

Crisan EV, Sands A. 1978. Nutritional value. En: Chang, S. T. y Hayes, W. A. (eds.). The biology and cultivation of edible mushrooms. New York : Academic Press. pp. 251-293.

Deacon J. 2005. *Fungal Biology*, Cambridge, MA: Blackwell Publishers, ISBN 1:3066-4050

Deacon JW. 1993. Introducción a la micología moderna. Editorial Limusa. Slp. pp. 350.

Deshpande MV. 1992. Proteinases in fungal morphogenesis. World Journal of Mycology and Biotechnology 8: 242-250.

Edens W, Goins T, Dooley D, Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. *Applie and Environmental Microbiology* 65 (7): 242-250.

Futoshi S, Ichijo N, Yamaguchi H, Nakatsumi H, Ando A, Iijima N, Oguri S, Uehara K, Nagata Y. 2004. Molecular properties of mycelial aggregate specific lectin of *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98(4): 257-262.

García JJ, Pedraza KD, Silva BC, Andrade MR, Castillo TJ. 1998. Hongos del estado de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. México. pp. 11-15.

García-Carreño L, Hernandez-Cortes P, Ezquerro M. 1996. Proteinase inhibition of fish muscle enzyme using legume seed extracts. *Journal of Food Protection* 59: 312-318.

Galhaup C, Goller S, Peterbauer C, Strauss J y Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.

González-Blanco PC, Larralde-Corona P, Viniestra-Gonzalez G. 1993. Image processing technique for measuring specific growth rates of *Gibberella fujikuroi*. *Biotech. Tech* 7 (1):57-62.

Gooday GW. 1972. Control of development of excised fruit bodies and stipes of *Coprinus cinereus*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 63: 391-399.

Griffin H. 1994. Introduction to the fungi. En *Fungal Physiology*. Editorial Wiley-Liss. New York. pp. 1-22

Gurr T. 1963. *Biological staining methods*. George T. Gurr Ltd. London.

Guzmán G, Mata G, Salmones D, Soto-Velazco C, Guzmán-Dávalos L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. Instituto Politécnico Nacional. México. pp. 245.

Herrera T, Ulloa M. 1998. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Fondo de Cultura económica-UNAM. México. pp. 552.

Jara-Seguel P, Peredo S, Palma-Rojas C, Parada E, Lara G. 2000. Quantitative karyotype of *diplodon chilensis*. *Gayana* 64(2).

Ji J. y Moore D. 1993. Glycogen metabolism in relation to fruit body maturation in *Coprinus cinereus*. *Mycology Research* 97(39):283-289.

Jirjis R. y Moore D. 1976. Involvement of glycogen in morphogenesis of *Coprinus cinereus*. *Journal of General Microbiology* 95: 348-352.

Justo MB, Guzmán GA, Mejía EG, Díaz CLG, Martínez G, Corona EB. 1998. Composición química de tres cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostreatus*). *Archivo Latinoamericano de Nutrición* 48(4): 359–363.

Larralde P, González-Blanco PC, Viniegra G. 1994. Comparison of alternative kinetic models for estimating the specific growth of *Gibberella fujikuroi* by image analysis techniques. *Biotechnology Technique* 8(4): 261-266.

Larralde-Corona CP. 1992. Acoplamiento energético en la germinación de *Aspergillus niger* CH4. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. UAM-Iztapalapa.

Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. 1999. Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. *Food Chemistry* 65(4): 477–482.

Marino RH, Ferreira A, Eurya KE, Cardoso QE. 2003. Morphomolecular characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer strains in relation to luminosity and temperature of fructification. *Scientia Agricola* 60(3): 531-535.

Martínez-Carrera D, Sobal M, Morales P, Martínez W, Martínez M, Mayett Y. 2004. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. Colegio de Posgraduados. México. pp. 44.

Matthews R. y Niederpruem I. 1973. Differentiation in *Coprinus lagopus*. Histology and ultrastructural aspect of developing primordia. *Archiv für Microbiology* 88: 169-180.

Miller G. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

Moda ME, Horii J, Fillet SME. 2005. Edible Mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. *Sci. Agric.* 62(2): 127-132.

Mol C. y H. Wessels. 1990. Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit-body stipes in *Agaricus bisporus*. *Mycology Research* 90: 480-488.

Moore-Landecker E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. 4a edición. Editorial Prentice Hall. USA. pp. 574.

Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. 1992. *Bioquímica de Harper*. El manual moderno México D.F.

Niederpruem J. 1970. Morphogenetic processes in *Schizophyllum* and *Coprinus*. *Genetics and Morphogenesis in the Basidiomycetes* (Ed. M. N. Schwalb y P. G. Miles), pp 105-134. Academic Press. New York.

Ohga S, Smith M, Thurston F, Wood A. 1999. Transcriptional regulation of laccase and cellulose genes in the mycelium of *Agaricus bisporus* during fruit body development on a solid substrate. *Mycological Research* 103: 1557-1560.

Ohga S, Smith M, Thurston F Wood A. 1999. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes in the mycelium of *Agaricus bisporus* during fruit body development on a solid substrate. *Mycological Research* 103:1557-1560.

Olivier-Laborde. 1991. <http://setascultivadas.com/articulojunio2003.html>.

Packer HL, Thomas CR. 1990. Morphological measurement on filamentous microorganisms by full automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng* 37:870-881.

Peczynska-Czoch W y Mordaski M. 1988. Actinomycetes enzymes. Actinomycetes in Biotechnology. Ed. M. Goodfellow., S. T. Williams y M. Mordaski. Academic press. London. pp. 219-283.

Pérez MR y Mata G. 2005. Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* en viruta de pino: obtención de nuevas cepas y evaluación de su producción. Revista Mexicana de Micología 20: 53-59.

Peberdy F. 1990. Fungal cell walls – A Review. En Biochemistry of the cell walls and membranes in fungi. (Ed. M.J. Jung M.W. Goosey y L.G. Copping), pp 6-9 Springer-Verlag. Berlin.

Pitson M, Seviour J, McDougall M. 1999. Intracellular and cell wall associated β -glucanases and β -glucosidases of *Acremonium persicinum*. Mycological Research 103:1217-1224.

Ponce L y Muñiz G. 1999. Enriquecimiento proteico de residuos lignocelulosicos con *Pleurotus ostreatus* para alimentación animal. En *Bioteconología 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). 563, México.

Ponton J. 2008. The fungal cell wall and the mechanism of action of Anidulafungin. Rev Iberoam Micol 25:78-82

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.

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

Salmones D, Mata G, Waliszewski KN. 2005. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. On coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource technology* 96: 537-544.

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

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

Sánchez C. 2004. Influence of the substrate on ultrastructure of *Pleurotus pulmonarius* fruit body primordia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (5): 691-694.

Sánchez C, Ruth Ryder **A**, Vilki Z, Robson G. 2010. Enrichment and identification of di (2-ethylhexyl) phthalate-degrading fungi from soil.

Sánchez C, Moore D. 1999. Conventional histological stains selectively stain fruit body initials of basidiomycetes. *Mycology Research* 103 (3): 315-318.

Sánchez C, Moore D. and Díaz-Godínez G. 2006. Microscopic observations of the early development of *Pleurotus pulmonarius* fruit bodies. *Mycologia* 98 (5): 682-689.

Shashirekha MN, Rajarathnam S, Bano Z. 2002. Enhancement of bioconversion efficiency and chemistry of the mushroom, *Pleurotus sajor-caju* (Berk and Br.) Sacc. Produced on spent rice straw substrate, supplemented with oil seed cakes. *Food chemistry* 76: 27-31.

Sietsma H y Wessels H. 1977. Chemical analysis de hyphal wall of *Shizophyllum commune*. *Biochemical Biophysics Acta* 496: 225-239.

Sturion GL y Oetterer M. 1995. Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.) originados de cultivos em diferentes substratos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 15(2): 189-193.

Szklarz G, Antibus R, Sinsabaugh R, Linkins A. 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*. 81 (2): 234-240.

Takao S. 1965. Organic acid production by Basidiomycetes. *Applied Microbiology* 13(5): 732-737.

Téllez-Téllez. 2002. Determinación de las propiedades bioquímicas de hifas jóvenes y maduras de la fase vegetativa de *Pleurotus pulmonarius*. Tesis de licenciatura, Biología, Universidad Veracruzana.

Téllez-Téllez M, Díaz-Godínez G, Sánchez C. 2003. Physiology of a colony of *Pleurotus pulmonarius* grown on media overlaid with a Cellophane membrane. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:212-216.

Téllez-Téllez M, Sánchez C, Montiel Gonzalez AM, Díaz-Godínez G. 2003. Laccase activities of the peripheral and central zones of the vegetative mycelium of colonies of *Pleurotus* ssp. *Microbiology & Microbial safety* 63:212-216.

Trevelyan E. y Harrison S. 1952. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochemical Journal* 50:298.

Valencia-del Toro G, Garín-Aguilar ME, Jiménez-Hernández J, Leal-Lara H. 2003. Producción de cepas coloridas de *Pleurotus* spp. en sustrato estéril y pasteurizado. *Revista Mexicana de Micología* 17: 1-5.

Van de Vooren J. G, Polder G, Van der Heijden GWAM. 1991. Application of image analysis for variety testing of mushroom. *Euphytica* 57:245-250.

Vnenchak P. y Schwalb M. 1989. Phenol oxides activity during development of *Coprinus cinereus*. *Mycological Research* 93 (4): 546-548.

Vogel F, Salmones D. 2000. Análisis comparativo de la productividad de cepas de *Pleurotus* spp.cultivadas en una planta comercial. Rev. Iberoamericana de Micología 17: 138-141.

Wessels H. 1978. Incompatibility factors and the control of biochemical processes. Genetic and Morphogenesis in the basidiomycetes (Ed. Marvi, N. S. y Philip, G. M.), pp. 81-103. Academic Press. London.

Wessels H. 1993. Fruiting in higher fungi. Advances in Microbial Physiology 34: 147-202.

Wessels JGH. 1994. Development of fruit bodies in homobasidiomycetes. In The Mycota, vol 1, Growth, Differentiation and Sexuality (ed. J G. H. Wessels & F. Meinhardt), pp. 351-366. Berlin, Heidelberg, New York: Springer- Verlag.

Zadrazil F. 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United State and adjacent Canada. Canadian Journal Botanica 71: 113-128.