



302827  
11  
UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C. *[Firma]*

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

ESTUDIO DE CEPAS  
MONOCARIOTICAS  
DE *Pleurotus ostreatus*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

JULIETA GONZALEZ TERAN VAZQUEZ

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1995



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.).**

**Bajo la dirección del Dr. Hermilo Leal Lara  
y de la M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo.**

### AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Hermito Leal Lara, por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Agradezco a la M. en B. Rebeca Ramirez Carrillo por su asesoría, su gran ayuda y apoyo durante el desarrollo de mi trabajo.

De igual forma , agradezco a todos los miembros del jurado su participación en la revisión de este trabajo.

Finalmente, agradezco al departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química de la U.N.A.M.

**A Dios, por permitirme  
alcanzar un sueño.**

## ÍNDICE

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1	Planteamiento del problema	1
1.2	Objetivos	4
1.3	Hipótesis	4

## CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1	Generalidades	5
2.2	Origen metabólico de los hongos y su clasificación	6
2.3	Comportamiento biológico de los Basidiomicetes	7
2.3.1	Morfología, estructura y reproducción	8
2.3.1.1	Fase vegetativa	8
2.3.1.2	Fase de reproducción asexual	9
2.3.1.3	Fase de reproducción sexual	9
2.3.1.4	Fructificación esporífera de la reproducción sexual	9
2.3.1.5	El himenio	10
2.3.1.6	El basidio	10
2.3.1.7	Las basidiosporas	10
2.3.2	Aspectos taxonómicos	11
2.3.3	Ciclo biológico	13
2.3.3.1	Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
2.3.3.1.2	Ciclo de vida en cepas dicariotes	15
2.3.4	Sexualidad en los hongos comestibles	17
2.3.5	Sistemas de apareamiento en los hongos (patrones de sexualidad)	17
2.3.5.1	Homotalismo	18
2.3.5.2	Heterotalismo	18
2.3.5.3	Modelo sexual en hongos comestibles cultivados	19
2.3.5.4	Compatibilidad tetrapolar	19
2.3.6	Fructificación bajo condiciones naturales	20
2.4	Características generales de <i>Pleurotus ostreatus</i>	21
2.5	Cultivo	21
2.5.1	Inducción de primordios	21
2.5.2	Prevención de contaminación	22
2.5.3	Necesidad de un control	22
2.5.4	Problemas que afectan el cultivo de <i>Pleurotus</i>	22
2.5.5	Ventajas del cultivo de <i>Pleurotus</i> sobre otros hongos, <i>Agaricus</i> y <i>Volvariella</i>	23
2.5.6	Enfermedades y presencia de plagas en los hongos comestibles	24
2.6	Cultivo de <i>Pleurotus</i> a escala comercial	25
2.7	Mejoramiento genético	27
2.8	Valor nutritivo de los hongos	30
2.9	Alternativas de conservación de hongos comestibles	32

### CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1	Diagrama general	33
3.1.1	Diagramas específicos	34
3.1.1.1	Diagrama para preparar inóculo de grano	34
3.1.1.2	Diagrama para la preparación e inoculación de la paja de trigo para obtener cuerpos fructíferos	35
3.1.1.3	Diagrama para la germinación de esporas	36
3.2	Material, reactivos y equipos	37
3.2.1	Material biológico	37
3.2.2	Material de laboratorio	39
3.2.3	Reactivos	39
3.2.3.1	Medios de cultivo	39
3.2.3.2	Reactivos generales	39
3.2.4	Equipo	40
3.3	Metodología	41
3.3.1	Medio de de cultivo: agar extracto de malta	41
3.3.2	Resiembra de cepas	41
3.3.3	Producción de inóculo de grano	43
3.3.4	Sustrato de paja	43
3.3.5	Hibridización de las cepas monocarióticas (dicariorización)	43
3.3.6	Recolección de la esporada	44
3.3.7	Germinación de esporas	44
3.4	Análisis estadístico	44

### CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Resultados	45
4.1.1	Evaluación de la velocidad de crecimiento	45
4.1.1.1	Análisis estadístico para la velocidad de crecimiento en agar extracto de malta y paja de trigo	48
4.1.1.2	Fructificación	53
4.1.2	Siembra en paja con inóculo de grano al 5% en frascos de vidrio	56
4.1.2.1	Recolección de esporas	61
4.1.2.2	Germinación	61
4.1.3	Estudio comparativo entre las fructificaciones de la primera y segunda fase del experimento	62
4.1.4	Siembra en paja (bolsas de polipapel) con inóculo de grano al 7.5%	64
4.1.4.1	Clasificación de cepas	64
4.1.5	Determinación de tipos de compatibilidad e hibridización	66
4.1.6	Siembra en paja (bolsas de polipapel) con inóculo de grano al 10 %	68
4.1.6.1	Fructificación de cepas dicariorotes	69
4.1.7	Eficiencia biológica	72
4.1.7.1	Análisis estadístico de la eficiencia biológica	75
4.2	Discusión	77



**CAPÍTULO V. CONCLUSIONES**

78

**BIBLIOGRAFÍA**

81

## **CAPÍTULO I**

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En busca de mejores fuentes de alimentación humana, para satisfacer las necesidades protéicas y nutricionales de la población (principalmente de aquella que habita en los países subdesarrollados) y en función de su bajo costo de producción y su obtención en grandes cantidades, en un lapso de tiempo relativamente corto, diversos investigadores estudian la posibilidad de manipular genéticamente las cepas de hongos comestibles para aumentar su producción y adaptación a las condiciones ambientales, debido a su facultad para crecer en diversos sustratos que anteriormente eran considerados como desechos agrícolas o forestales, tales como pajas, bagazos, cortezas, tocones, etcétera (Zadrazil, 1974, Leal y Ramírez, 1990).

Más de 15 especies de hongos, agrupadas en varios géneros, son cultivadas comercialmente a gran escala en diferentes partes del mundo, 13 de las cuales se encuentran creciendo en forma natural en diferentes zonas de México y consecuentemente pueden llegar a producirse en el país (Tabla 1).

**Tabla 1.** Especies de hongos comestibles que crecen en México y que son susceptibles de ser cultivados.

*Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc.  
*Auricularia fusco-succinea* (Mont.) Farl.  
*Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc.  
*Diclyophora indusiata* (Vent. ex Pers.) Desv.  
*Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing.  
*Lentinus cubensis* (B. & C.) Sing  
*Pholiota mutabilis* (Schaeff. ex Fr.) Kumm  
*Pleurotus cornucopiae* (Paul. ex Fr.) Gill.  
*Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm.  
*Pleurotus smithii* Guzmán.  
*Tremella fuciformis* Berk.  
*Volvariella bakeri* (Murr.) Shaffer.  
*Volvariella bombycina* (Schaeff. ex Fr.) Sing.

En México solamente el conocido "champiñón", *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, ha sido cultivado a escala comercial desde hace más de 20 años, recientemente se empiezan a cultivar diferentes especies de *Pleurotus* sobre paja de trigo, utilizando, tanto cepas nativas como extranjeras (Martínez, Quirarte, Soto, Salmones y Guzmán, 1984).

*Pleurotus* es un hongo que se ha cultivado en una gran variedad de sustratos, entre los cuales se han reportado los siguientes: pajas de casi todo tipo de cereales como trigo, arroz, maíz, sorgo, mijo, avena, mijo, centeno y cebada, rastrojo de frijol, pulpas de café y de cardamomo, mazorcas, rastrojo y zacate de maíz, mazorca y cáscara de cacao, desecho de algodón, pseudotallos de plátano, bagazos de caña de azúcar, de citronela, maguey, bagazo de henequén fermentado, polocote (*Tithonia tubaeformis* L. (planta ruderal), madera de Inga, hojarasca de árboles caducifóleos de parques y jardines y pasto o bien, se utiliza una mezcla de sustratos, por ejemplo, trigo o maíz con polocote, maguey tequilero fermentado y paja de trigo o pulpa de café con cáscara de cacao, bagazo de caña enriquecido con pulpa de café o paja de cebada, una combinación de maíz, frijol y cebada, entre otros. En México se ha estudiado o cultivado en la mayoría de los sustratos anteriormente mencionados (De León, Morales, De Agreda y Rolz., 1983; Morales, 1987; Acosta, Bustos y Portugal, 1988; Martínez-Carrera, Morales y Sobal, 1988; Chang y Hayes, 1989; Soto-Velazco, Guzmán-Dávalos y Rodríguez, 1989; Guzmán y Salmones, 1990; Martínez-Carrera, Morales y Sobal, 1990; Sánchez, 1993b; Sánchez, 1993c; Burgos, Ancona y Guzmán, 1994; Marín, Ramírez y Ramírez, 1994; Pérez y Alfaro, 1994).

*Pleurotus ostreatus* es un hongo comestible sumamente apreciado desde tiempos antiguos y ha sido cultivado en Europa y Asia, en la actualidad se le cultiva a escala comercial en Japón e Italia, donde principalmente se utilizan como sustrato los desperdicios vegetales lignocelulósicos; como aserrines de varias clases de madera, desperdicios de la industria papelera y en pajas de casi todo tipo de cereales. En Singapur se cultiva sobre desechos de algodón. En la India se ha sembrado sobre paja de arroz y trigo, pseudotroncos de banana, polvo de sierra y desechos de periódico (Block, Tsao y Han, 1958; Omori, 1974; Zadrazil, 1974; Jablonsky, 1975; Keneshiro, 1977; Omori, Kanno y Yoshida, 1977; Leong, 1989).

La gran diversidad de sustratos en los que se puede desarrollar *Pleurotus ostreatus* se debe a la habilidad para producir enormes cantidades de enzimas hidrolasas y oxidasas, degradando complejas substancias lignocelulósicas, convirtiendo así, los desechos agrícolas y forestales en biomasa apta para el consumo humano en forma de hongo o cuerpo fructífero o también, aumentando la digestibilidad del sustrato residual para su uso en la alimentación del ganado (con mayor cantidad de celulosa disponible, aunada a la riqueza proteínica dada por el crecimiento micelial) y ayudando a una rápida reincorporación de los desechos agro-industriales y forestales a la naturaleza, por ejemplo, en forma de fertilizantes (Zadrazil, 1974; Rajarathnam y Bano, 1983; Martínez, Quirarte, Soto, Salmones y Guzmán, 1984).

De los hongos comestibles, las cepas de *Pleurotus* empleadas comercialmente son dicariones conocidas también como dicariontes o dicarióticas (del griego *dis*, dos y *karyon* nuez o núcleo) sus células contienen dos núcleos capaces de complementarse genéticamente, dichas cepas son del tipo silvestre u obtenidas de algunas colecciones internacionales a las que no se ha realizado mejoramiento genético. Las monocariones son también conocidas como monocariontes o monocarióticas (del griego *mónos*, solo o único y *Káryon*, nuez o núcleo) son organismos cuyas células contienen un solo núcleo cada una, se cree que algunas cepas monocariones son capaces de fructificar, por lo tanto pueden ser empleadas en la producción comercial de dicho hongo. En general, a nivel nacional se busca elevar la producción optimizando las condiciones ambientales y de

cultivo (sustratos con los nutrientes indispensables para un buen desarrollo de los cuerpos fructíferos) para cada cepa, pero sin manipulación genética. Una alternativa para obtener cepas comerciales es utilizar monocariotes y a partir de ellos realizar un mejoramiento genético que permita obtener cepas dicarióticas aptas para las diferentes condiciones locales (I Herrera y Ulloa, 1990).

*Pleurotus ostreatus* se ha logrado producir a nivel industrial en varios países y recientemente en algunos estados de la República como Veracruz, Morelos, México y Jalisco. En Puebla y Chiapas se ha empezado a trabajar en plantas pilotos (Marín, Ramírez y Ramírez, 1994).

La industria nacional productora de hongos se halla escasamente desarrollada y poco estudiada. La tecnología que se emplea es prácticamente estándar, fue introducida al país hace aproximadamente una década y se haya limitadamente difundida (Villegas de Gante y Pérez, 1994).

## **1.2 OBJETIVOS.**

1. En el presente trabajo se determinará si las 22 cepas monocariotes de *Pleurotus ostreatus* en estudio son capaces de crecer sobre paja de trigo y producir cuerpos fructíferos por sí solas. Para ello se probarán las características de las cepas, que de acuerdo a sus donadores, se presume que 10 de ellas son capaces de fructificar.
2. Si se logra obtener cuerpos fructíferos de alguna de las cepas probadas se tratará de elucidar su ciclo de vida. Es decir, se verá si son capaces de producir esporas, lo cual nos determinará si existe recombinación genética o no, entre las cepas.
3. Se estudiará si al obtener dicariotes a partir de monocariotes fructificantes se logra incrementar el rendimiento de hongos para su producción comercial.

## **1.3 HIPÓTESIS.**

1. Como la paja de trigo es un sustrato adecuado para las cepas dicariotes se espera que también lo sea para el crecimiento micelial y el desarrollo de cuerpos fructíferos de las cepas monocariotes bajo las condiciones estudiadas.
2. Se espera que al menos 10 de las cepas estudiadas sean capaces de producir cuerpos fructíferos.
3. Es muy probable que las cepas que son capaces de fructificar produzcan esporas y presenten un ciclo de vida similar a los dicariotes.
4. Por lo general, se sabe que las cepas comerciales provienen de 2 monocariotes incapaces de fructificar por lo cual al hibridizar 2 monocariotes fructificantes se espera que su rendimiento se va incrementado.

## CAPÍTULO II

# ANTECEDENTES

## 2.1 GENERALIDADES

En fechas recientes se ha puesto especial interés en la búsqueda de nuevas fuentes de alimento a nivel mundial y nacional. Se han tratado de aprovechar al máximo los recursos naturales incluyendo la utilización de aquellos que antes se consideraban como desperdicios: desechos de las industrias agrícolas y forestales tales como pajas, bagazos, cáscaras, cortezas, tocones, etcétera (Leal y Ramírez, 1990).

Más de la mitad de la producción agrícola se queda como material de desecho. Algunos de estos desechos son usados como abono y otros son quemados (provocando otro tipo de contaminación). Actualmente se les puede dar un re-uso transformando dichos desechos en biomasa con el cultivo de hongos comestibles (Zadrazil, 1974).

Algunos hongos desempeñan una función importante en el equilibrio ecológico de la naturaleza en muchos aspectos: colaboran en el mantenimiento de la fertilidad de los suelos, descomponen rápidamente sustancias orgánicas complejas en otras más sencillas utilizables por plantas o animales (poseen un complejo sistema enzimático, el cual les permite, según la especie, degradar moléculas de alto peso molecular como la celulosa, la lignina, los taninos, etcétera) y además, los cuerpos fructíferos que producen ciertos basidiomicetes, como *Pleurotus* pueden utilizarse en la alimentación del hombre. En determinadas épocas constituyen un alimento sano, abundante y nutritivo. En la estación de lluvias las setas se encuentran frecuentemente en las praderas y bosques húmedos, de donde las colectan los campesinos, que en ocasiones confunden las especies alimenticias con hongos venenosos corriendo el riesgo de sufrir graves intoxicaciones (Herrera y Ulloa, 1990; Sánchez, 1993a)

Desde tiempos prehispánicos al presente en nuestro país se utilizan los hongos en la alimentación (tradición micófaga). Se sabe que existen más de 200 especies comestibles que crecen en diversos tipos de bosques y que son consumidos en grandes cantidades por la población indígena y campesina del país, o en menor grado por la población urbana y suburbana, mediante la venta en los mercados. La producción de hongos en el bosque está supeditada al clima, solo crecen en época de lluvia en los meses de junio a septiembre (Hernández, 1993).

## 2.2 ORIGEN METABÓLICO DE LOS HONGOS Y SU CLASIFICACIÓN.

Desde el tiempo de Aristóteles (siglo IV aC) hasta mediados del siglo XIX los hongos habían sido clasificados dentro del reino vegetal, ya que para la mayoría de los biólogos era suficiente dividir a los seres vivos en sólo dos reinos, el de las plantas y de los animales. En 1982 surgió una nueva clasificación de todos los seres vivos, basándose en las diferencias entre procariotes y eucariotes,



en dos superreinos: 1) Prokaryonta, cuyos representantes son organismos procarióticos (microorganismos sin núcleo verdadero) y que comprende sólo el reino Monera (bacterias y cianobacterias). 2) Eukaryonta, que comprende a los seres eucarióticos (algunos son microorganismos; pero la mayoría son organismos más grandes y con núcleo verdadero en sus células), en el cual se incluyen cuatro reinos: a) Protista (algas, protozoarios, mohos miceliales, hongos acuáticos y anfibios con formas flageladas, y muchos otros organismos acuáticos parásitos); b) Fungi (mohos, setas y otros hongos macroscópicos y líquenes); c) Animalia (animales metazoarios con o sin columna vertebral), y d) Plantae (musgos, helechos, plantas con conos y plantas con flores).

En el reino Fungi se establecen dos divisiones naturales: Myxomycota y Eumycota y una división artificial: Lichenes. Éstas a su vez presentan subdivisiones y clases.

La clasificación taxonómica de *Pleurotus ostreatus* es la siguiente:

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Basidiomycotina
Clase	Holobasidiomycetes
Subclase	Hymenomycetidae (Himenomicetes)
Orden	Agaricales
Familia	Tricholomataceae
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>ostreatus</i>

(Herrera y Ulloa, 1990)

Algunas rutas metabólicas básicas de las plantas parecen ser similares a las de los animales, mientras que otras parecen tener un ámbito más restringido. La producción de metabolitos primarios y secundarios depende de los ciclos metabólicos fundamentales de los tejidos vivos. Las células vivas vegetales poseen una estructura altamente organizada, con diversos organelos que permiten la creación de ambientes químicos diversos en el interior de una célula y que junto con las enzimas y coenzimas catalizan la producción de diferentes sustancias.

Uno de los ciclos fundamentales de las plantas verdes es la fotosíntesis, mediante la cual el dióxido de carbono de la atmósfera es convertido en azúcares. La fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos; conjuntando dos procesos que precisan de luz: la producción de adenosín-trifosfato (ATP), adenosín-difosfato (ADP) y fosfato o ciclo del carbono, y la descomposición del agua por la energía de la luz o reacción de Hill.

Otras rutas metabólicas básicas son el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la ruta de la glucólisis de Embden-Meyerhoff; la formación e hidrólisis de heterósidos (conjunto de

combinaciones de azúcares con geninas, por ejemplo glucósido); degradación de ácidos grasos, biosíntesis de ácidos grasos saturados e insaturados; biosíntesis de compuestos aromáticos por la vía del ciclo sikínico; biosíntesis de la endócerina y tetraciclina; de aminoácidos, péptidos y proteínas; biosíntesis de compuestos isoprenoides y terpenoides, entre otros. Dichas rutas metabólicas básicas constituyen los orígenes del metabolismo secundario de las plantas (Trease y Evans, 1988).

Los hongos no son autótrofos como las plantas, por lo tanto, no sintetizan compuestos sino los absorben tal y como los encuentran en la naturaleza o bien, los degradan.

La lignina es un componente estructural de la planta que le confiere rigidez y resistencia a la tensión mecánica, así como al ataque microbiano. La degradación de la lignina es un proceso que sucede en la naturaleza completando el ciclo de carbono. El proceso de biodegradación de los tejidos vegetales se debe a la acción de varias clases de microorganismos que muestran una especificidad sobre cada uno de los principales componentes de los tejidos vegetales, por ejemplo, hemicelulosa, celulosa y lignina. La biodegradación de la lignina por los microorganismos es un proceso lento; pero se ha encontrado que ciertos hongos pueden degradar la lignina. Estos hongos se encuentran clasificados dentro de tres categorías: hongos de la pudrición blanda, hongos de la pudrición oscura y hongos de la pudrición blanca. Esta denominación se basa en los cambios físicos causados en la madera por la acción de estos hongos. Los hongos de la pudrición blanda como ciertas especies de *Chaetomium* atacan parcialmente la lignina y carbohidratos de fácil degradación; los hongos de la pudrición oscura causan únicamente cambios menores en la estructura de la lignina y atacan completamente la celulosa, entre ellos se encuentran varios Basidiomicetos como *Lentinus lepideus* y *Lenzites sepiaria*, entre otros; mientras que los de la pudrición blanca son capaces de degradar completamente la lignina dejando visible la celulosa, que es blanca. Solo los hongos de la pudrición blanca producen fenoloxidasas extracelulares, enzimas que hidroxilan los anillos aromáticos y pueden causar una ruptura oxidativa de los anillos aromáticos y otras reacciones que permiten la degradación de la lignina, como son la formación de radicales libres, los que pueden incluir la ruptura de los enlaces entre el anillo aromático y la cadena lateral de fenil propano (Kirk, Cornors y Zeikus, 1977; Kirk, Higuchi y Chang, 1981 y Herrera y Ulloa, 1990).

*Pleurotus ostratus* es un hongo saprófito de la madera, se le clasifica como de la pudrición blanca (porque ataca selectivamente a la lignina o los polisacáridos vegetales), en la naturaleza se encuentra fructificando en los troncos de árboles muertos (Lelley y Schmaus, 1976; Guzmán, 1977; Chang y Hayes, 1978; Delmas, 1979).

### 2.3 COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE LOS BASIDIOMICETES.

Los basidiomicetes llamados también basidiomicetos o basidiomicotinos han sido estudiados desde principios del siglo pasado por Person y Fries; presentan una fase vegetativa y una o varias fases de reproducción. La reproducción puede ser asexual y sexual, predominando o alternando una con respecto a la otra (Herrera y Ulloa, 1990).

Los hongos son organismos heterótrofos, es decir, no pueden sintetizar los compuestos de carbono y las sustancias necesarias para sobrevivir debido a que carecen de clorofila y, por lo tanto de la capacidad para efectuar la fotosíntesis. Para desarrollarse requieren azúcares simples como glucosa, sacarosa o maltosa, de la cual obtienen la energía necesaria para sintetizar sus proteínas; también requieren sales minerales (incluyendo nitrógeno de origen inorgánico) y agua. A nivel de laboratorio se ha determinado que necesitan los siguientes elementos: C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe y Zn para su buen desarrollo. Algunos también requieren vitaminas que no pueden sintetizar como tiamina, biotina o piridoxina. Como fuente de nitrógeno prefieren amoníaco, nitratos y en ocasiones requieren nitrógeno orgánico obtenido de asparagina o también de algunos ácidos grasos.

La mayoría de los hongos son parásitos en la naturaleza o se desarrollan como saprófitos en medios definidos con temperaturas alrededor de 20 a 37 °C (Burnett, 1975; Huerta, 1993).

### **2.3.1 Morfología, estructura y reproducción.**

**2.3.1.1 Fase vegetativa.** Las estructuras somáticas características de esta fase son los micelios que a su vez están constituidos por hifas microscópicas como unidad básica. En su interior la hifa contiene citoplasma con núcleo eucariótico, mitocondrias, retículo endoplasmático, dictiosomas, vacuolas y ribosomas, lípidos e inclusiones cristalinas; sus paredes están constituidas principalmente por quitina en combinación con diversos polisacáridos (por ejemplo hemicelulosa) y pequeñas cantidades de lípidos.

La hifa es septada tanto en la fase vegetativa como en las de reproducción sexual y asexual de los basidiomicetes. El núcleo generalmente es haploide en la hifa, pero en algunos hongos existe como diploide.

El micelio es la expansión simétrica en forma radial de una hifa, a dicha etapa se le denomina crecimiento vegetativo (Burnett, 1975).

Los basidiomicetes, durante su ciclo biológico generalmente pasan por tres fases de desarrollo micelial que corresponden a tres tipos de micelio: el primario, el secundario y el terciario, este último es característico de la fase de reproducción sexual de los hongos y deriva del micelio secundario, que se organiza en tejidos especializados para formar cuerpos fructíferos.

El micelio primario, por lo común, se origina de la germinación de una basidiospora y está constituido por hifas de células generalmente uninucleadas o monocarióticas y haploides, no obstante, en algunas especies, este micelio puede tener células multinucleadas en la etapa inicial y en etapas posteriores de su desarrollo presenta un núcleo haploide por célula.

El micelio secundario deriva del primario y está constituido por hifas de células binucleadas o dicarióticas. La dicariotización de las células del micelio primario se inicia mediante la anastomosis de células con genes compatibles, monocarióticas y haploides, cuando se efectúa plasmogamia sin que haya cariogamia. La célula binucleada es la base del micelio dicariótico o dicarionte,

característico de los basidiomicetos o basidiomicetes en el cual todas las células se mantienen binucleadas, durante una larga fase del ciclo biológico. La estabilidad dicariótica de las células se mantiene por el mecanismo de formación de fibulas o conexiones de grapa en la llamada dicariófase (Leal, 1980; Herrera y Ulloa, 1990; Alcántara, 1990).

**2.3.1.2 Fase de reproducción asexual.** En muchos basidiomicetes no se conoce o es poco importante este tipo de reproducción; no obstante, en un gran número de ellos, es común la formación de yemas, artrosporas, oídios y conidios. También puede presentarse la multiplicación vegetativa por fragmentación del micelio o por reproducción de bulbillos o bulbillos y esclerocios (Herrera y Ulloa, 1990).

**2.3.1.3 Fase de reproducción sexual.** Los hongos basidiomicetes presentan en algún momento de su ciclo biológico, dos fenómenos que son fundamentales en el proceso de reproducción sexual: la plasmogamia y la cariogamia; entre ambos puede haber una larga etapa de vida vegetativa que corresponde a la fase dicariótica. Una vez que se efectúa la cariogamia en una célula dicariótica especializada que recibe el nombre de basidio, se presenta la meiosis en la misma, formándose cuatro núcleos que emigran a sendas yemas del basidio, posteriormente se produce, de cada uno de estos brotes, una espora exógena llamada basidiospora, la cual se conserva sobre una pequeña proyección del basidio, conocida con el nombre de esterigma, que corresponde a la base de la yema original, hasta el momento en que alcanza la madurez y se desprende, ya sea en forma pasiva o dinámica (Herrera y Ulloa, 1990).

**2.3.1.4 Fructificación esporífera de la reproducción sexual.** Esta recibe el nombre de basidiocarpio, está constituida por micelio terciario organizado en tejidos plectenquimatosos más o menos complejos en los cuales las hifas pueden ser todas de un solo tipo, el de las llamadas hifas generativas, que regularmente presentan fibulas por ser dicarióticas y por conservar la capacidad de crecer y dar origen a otras hifas (tejido monomítico).

El micelio terciario se inicia en pequeños cuerpos de hifas compactas o primordios de las fructificaciones, los cuales se desarrollan en basidiocarpos de múltiples formas según los grupos taxonómicos y las especies de hongos de los llamados macromicetos o macromicetes, con fructificaciones macroscópicas (Herrera y Ulloa, 1990).

Los cuerpos fructíferos de los basidiomicetes pueden estar abiertos desde las primeras fases de su desarrollo o bien permanecer cerrados, por lo menos hasta el momento en que maduran las esporas. En los Agaricales el himenóforo queda expuesto una vez que maduran las esporas, sin que se desintegre el himenio (fructificación hemiangiocárpica). *Pleurotus ostreatus* se considera gimnocárpico porque algunos de sus cuerpos fructíferos se abren desde etapas tempranas de su desarrollo para exponer la capa fértil que produce las esporas. Los cuerpos fructíferos son pobres durante el desarrollo del esporoforo y las lamelas nunca son cubiertas por un velo. Las esporas son producidas inmediatamente después que las primeras lamelas son generadas y un gran número de esporas son soltadas por cada cuerpo fructífero antes de la cosecha (Eger, 1978a).

**2.3.1.5 El himenio.** Casi todos los basidiomicetes producen los basidios con sus correspondientes basidiosporas en una capa o membrana continua y organizada de hifas, conocidas como himenio. El himenio es la capa fértil de la fructificación o basidiocarpo y está distribuido en estructuras especializadas, como láminas, dientes y tubos, llamadas himenóforos. Estos ocupan determinadas áreas de la fructificación, constituyendo capas donde siempre están presentes las hifas basidiógenas, que dan origen a los basidios, los cuales se encuentran generalmente ordenados en forma de empalizada y con frecuencia entremezclados con elementos estériles denominados paráfisis (cuando su morfología es semejante a los basidios) o cistidios, cuando se trata de estructuras de mayor tamaño que los basidios.

El himenio más frecuente en los Hymenomycetes, es el de forma empalizada, al cual se le ha denominado también euhimenio (Herrera y Ulloa, 1990).

**2.3.1.6 El basidio.** Se presentan dos tipos fundamentales de basidios en los Basidiomycotina: el heterobasidio y el holobasidio u homobasidio. En ambos, pueden distinguirse dos fases: el probasidio o célula donde se efectúa la cariogamia y el metabasidio que es la fase en donde se efectúa la meiosis y, posteriormente, se forman las basidiosporas.

Los dos núcleos del probasidio o basidio joven, se fusionan en el proceso de la cariogamia y el núcleo diploide cigoto así formado se divide por meiosis y da origen a 4 núcleos haploides en el llamado metabasidio, que es la fase más avanzada del desarrollo del basidio. Al mismo tiempo, se forman generalmente cuatro pequeños divertículos que reciben el nombre de esterigmas. Los núcleos emigran hacia estos, y en el ápice de cada esterigma se forma una basidiospora casi siempre uninucleada, de manera que se constituyen 4 basidiosporas haploides en cada basidio. No obstante, algunos basidios producen de 1 a 8 o más basiosporas y estas a veces son binucleadas (Herrera y Ulloa, 1990).

**2.3.1.7 Las basidiosporas.** Son estructuras unicelulares haploides producidas casi siempre en una sola serie. Su forma generalmente es esferoidal, ovoide, elíptica, alatoide o cilíndrica. Son lisas u ornamentadas, incoloras o pigmentadas; en este último caso, su color puede ser blanco, amarillo, verde, anaranjado, rosado, ocre, púrpuro, moreno o negro, con todas las tonalidades intermedias. Para determinar el color de las esporas es necesario lograr un depósito en masa de las mismas, denominada comúnmente esporada.

Las basidiosporas, al germinar, generalmente producen micelios primarios, debido a que son uninucleadas y haploides, pero cuando las basidiosporas son binucleadas pueden originar directamente un micelio secundario. En ocasiones las basidiosporas, al germinar, no forman de inmediato un micelio, sino que producen basidiosporas secundarias, o bien, producen blastosporas y conidios, que al germinar dan origen a los micelios (Herrera y Ulloa, 1990).

### 2.3.2 ASPECTOS TAXONÓMICOS.

De acuerdo con los criterios taxonómicos tradicionales, las características, muy variables para la identificación de un hongo son:

a) **El color.** Existen hongos de coloración roja, rosácea, café, blanca, etcétera. El color es una característica de suma importancia para la identificación de los hongos, ya que permite diferenciar especies.

b) **El pileo o sombrero.** Pueden encontrarse gran variedad de formas como: embudo, campanulado, plano, convexo, cilíndrico, giboso, etcétera; tener variaciones sobre sus márgenes (dentados, enrollados, levantados, etcétera). La textura del pileo puede presentar sensación de humedad, ser mucilaginoso, aceitoso, sedoso, con escamas, vellosidades, estrias, brillantez u ornamentaciones (cavidades, grietas, arrugas, espinas, etcétera).

c) **El estípite o tallo.** Algunos hongos pueden no tener estípite. Cuando lo tienen puede estar ubicado justo abajo del centro del pileo, de manera lateral o excéntrica. Puede presentar rizoides. La forma y textura del estípite varía, puede ser bulboso, torcido, rígido, liso, quebradizo, leñoso, flexible, correooso, etcétera.

d) **Volva o anillo.** La presencia o forma de la volva en la base del tallo o de un anillo en la parte superior del mismo.

e) **Las estructuras que forman el himenio.** Las láminas (su forma, tamaño, densidad y unión con el estípite), la presencia de dientes o poros.

f) **El olor y sabor del hongo** (características de importancia secundaria) ayudan a la confirmación de algunas especies en particular. El olor puede ser agradable, imperceptible, nauseabundo, etcétera (Guzmán, 1990; Delgado, 1990; Sánchez, 1993a).

Las principales partes de un hongo (cuerpo fructífero o basidiocarpo) se presentan a continuación, Figura 1 (Sánchez, 1993a).

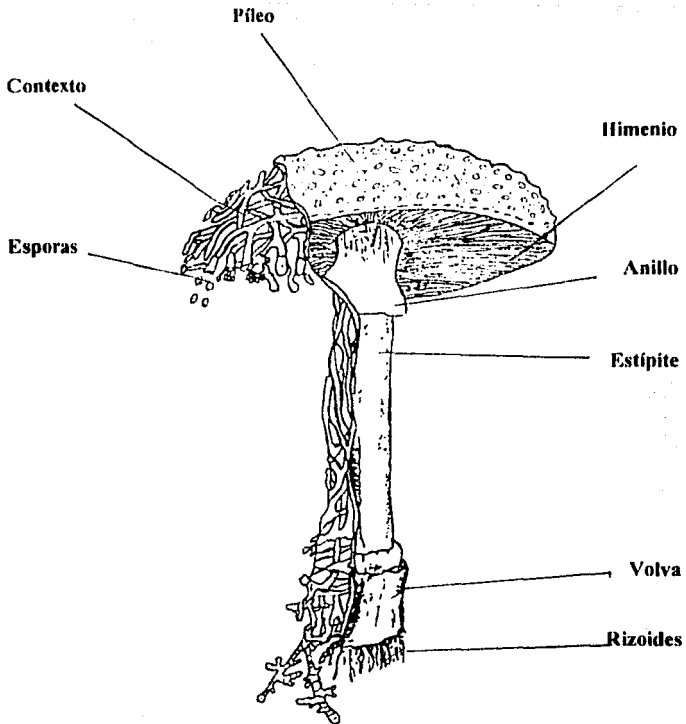


Figura 1. Partes que conforman un cuerpo fructífero.

### 2.3.3 CICLO BIOLÓGICO.

Aunque cada grupo de los Basidionycotina presenta modalidades en su ciclo biológico, en general se realiza en la siguiente forma: una vez que las basidiosporas germinan dan origen a un micelio primario, excepto cuando presentan dos núcleos, caso en el cual pueden originar un micelio secundario ( $n + n$ ). Cuando se desarrollan micelios primarios, a partir de ellos se forma el micelio secundario mediante plasmogamia, la cual se efectúa generalmente por somatogamia o por espermatización. El micelio secundario también puede formarse por unión de basidiosporas haploides ( $n$ ), de brotes de basidiosporas o de atrosporas de dos micelios monocarióticos.

El micelio secundario ( $n + n$ ) puede pasar por varias fases, en las que se producen esporas de propagación, como son las eciosporas y las uredosporas, antes de llegar a la fase en que se producen las teliosporas, las cuales dan origen a los basidios y estos a las basiosporas, como es el caso de los Uredinales. En los Ustilaginales el ciclo biológico es parecido al del grupo mencionado, por la formación de teliosporas, pero no hay producción de eciosporas y uredosporas aunque pueden formarse conidios de otro tipo. Cuando no se producen estas esporas de propagación, el micelio secundario se organiza para formar el terciario, el cual constituye el basidiocarpo, en el que se desarrollan los basidios que dan origen al cigoto ( $2n$ ) y las basiosporas ( $n$  o  $n + n$ ), como sucede en la mayoría de los Basidionycotina: Holobasidiomycetes y varios Heterobasidiomycetes (Tremellales). No obstante, estos últimos grupos también pueden presentar fases conidiales de diversos tipos en determinadas condiciones ecológicas o en medios de cultivo artificiales. Figura 2 (Herrera y Ulloa, 1990).



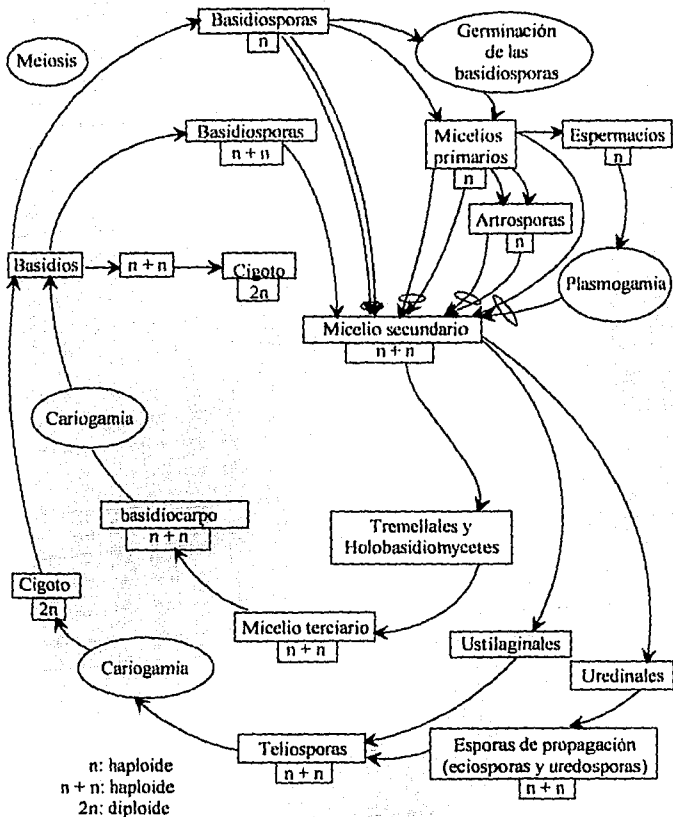


Figura 2. Ciclo biológico general de los Basidiomycotina

### **2.3.3.1 Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus***

El ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus* implica una serie de etapas que van desde la germinación de las esporas hasta la formación de los cuerpos fructíferos o esporoforos, conocidos vulgarmente como setas u hongos, siendo esta la última etapa del ciclo de vida, fase reproductiva (Ramírez, 1989).

*Pleurotus ostreatus* pertenece a la clase de los basidiomicetes, caracterizada por formar cuatro esporas sexuales. La esporulación sexual produce esporas haploides (n) con cuatro tipos de compatibilidad, las cuales germinan para formar el micelio monocariótico por medio de divisiones mitóticas. Este micelio puede permanecer en la fase vegetativa por tiempo indefinido, si no se dan las condiciones apropiadas de luz, temperatura y humedad relativa del medio ambiente (Padilla, 1990).

El micelio es funcionalmente similar al sistema reticular de los vegetales (raíces), además tiene como función la sujeción del esporoforo al suelo o sustrato. Al madurar los esporoforos se producen las esporas sexuales en las lamelas del sombrero y son expulsadas al medio ambiente cuando se abre totalmente el esporoforo Figura 3 (Ramírez 1989).

### **2.3.3.1.2 Ciclo de vida en cepas dicariotes.**

Se parte de un micelio secundario (n + n) en donde las células son típicamente binucleadas. El estado binucleado comienza cuando se fusionan los núcleos de dos células uninucleadas, sin que haya meiosis después de la mitosis. La célula binucleada produce una ramificación a la cual emigra el par nuclear; los dos núcleos se dividen conjuntamente y los núcleos hermanos se distribuyen en dos células hijas para iniciar el micelio binuclear. El micelio terciario está representado por los tejidos especializados que se originan para formar los esporoforos de los basidiomicetes. Los basidiomicetes producen basidios en cuerpos fructíferos altamente organizados.

El basidio se origina como célula terminal de una hifa binucleada y se encuentra separada de la misma por un tabique a cuyo lado generalmente se encuentra una fibula. Al principio el basidio es angosto y corto, pronto se agranda y se hace más ancho. Al mismo tiempo que tienen lugar estos cambios externos, en el interior del basidio joven los núcleos se fusionan por medio de la cariogamia (2n) y el núcleo cigótico sufre meiosis, dando lugar a cuatro núcleos haploides (n). Del basidio emergen cuatro esterigmas y sus extremos se agrandan para formar los esbozos de las basidiosporas. Los cuatro núcleos pasan a las basidiosporas jóvenes que van a completar su desarrollo como células uninucleadas haploides Figura 3 (Alcántara, 1990).

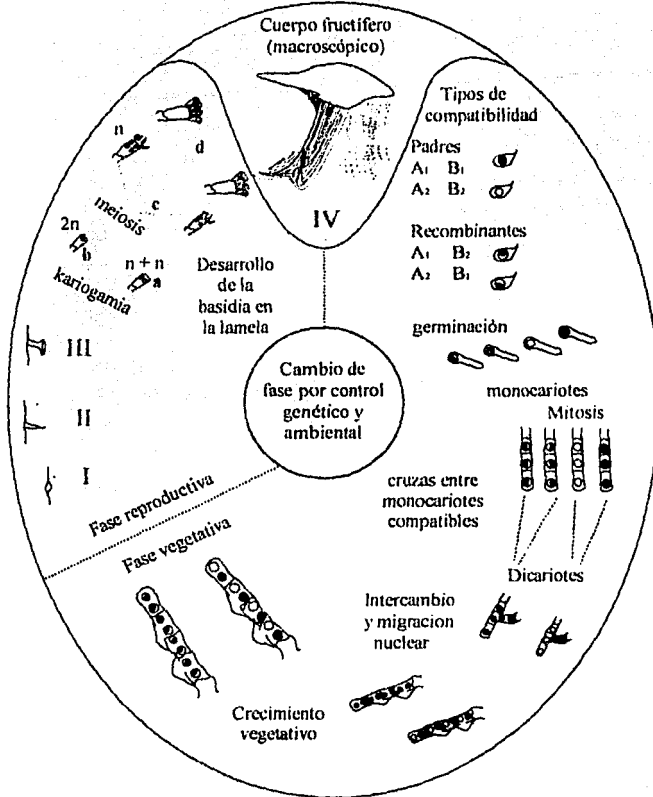


Figura 3: Ciclo de vida de una cepa dicariote de *Pleurotus ostreatus*.

### 2.3.4 SEXUALIDAD EN LOS HONGOS COMESTIBLES.

En general el proceso de sexualidad en los hongos consta de 3 periodos importantes:

La primer etapa esencial es plasmogamia, la cual es la fusión del citoplasma de los dos individuos unidos (células), los núcleos de las dos células son concentrados en un citoplasma común.

La segunda etapa esencial es conocida como cariogamia o fusión nuclear, la cual no se presenta en los basidiomicetos, los basidios ya binucleados (los dos núcleos derivan de la unión de dos hifas vegetativas uninucleadas pero sin fusión de sus núcleos).

La tercer etapa esencial es la meiosis o división nuclear, en la cual el número de cromosomas es reducido de diploide a un número haploide; el producto de la meiosis son cuatro núcleos. A través de los procesos de sexualidad, ocurre recombinación genética y segregación (Figura 4 (Chang, 1982).

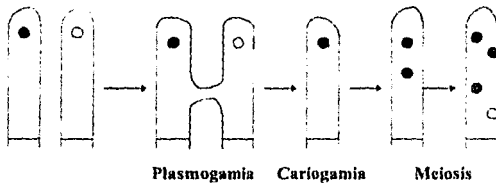


Figura 4. Reproducción sexual.

### 2.3.5 SISTEMAS DE APAREAMIENTO EN LOS HONGOS (PATRONES DE SEXUALIDAD).

En los hongos comestibles se representan 2 tipos de fertilidades: autofértiles y autoestériles. Los autofértiles, también conocidos como homotálicos u homomixis es probablemente la forma de reproducción sexual más común en los hongos superiores o basidiomicetos, este tipo de especies representan solamente un 10%. Las especies autoestériles también conocidas como heterotálicas o dimixis representan el 90% de los hongos y de los cuales el 25% son bipolares y el 65% son tetrapolares (Burnett, 1975).

### 2.3.5.1 Homotalismo.

La estructura fructificante puede ser producida por un único micelio monocariote. Potencialmente un hongo autofértil no necesariamente es homocigoto y de una variedad de situaciones, quizá puede resultar un sistema de regulación imprecisa en heterocigotos. Dos tipos de homotalismo fueron encontrados entre especies de autofertilidad:

- a) **Homotalismo primario:** el micelio monocariótico, proveniente de un núcleo meiótico individual puede dar origen a un heterocarion para completar su ciclo sexual.
- b) **Homotalismo secundario:** el micelio dicariótico fértil proviene de una basidiospora con dos núcleos meióticos de diferentes tipos de apareamiento o compatibilidad (Raper, 1966).

### 2.3.5.2 Heterotalismo.

Para completar el ciclo sexual debe de haber un apareamiento entre dos micelios monocarióticos. En los hongos comestibles se han encontrado dos sistemas de apareamiento dentro del heterotalismo:

- a) **Sistema de apareamiento bipolar;** determinado por un solo factor de compatibilidad conocido como: factor A. Por lo tanto solo dos tipos de apareamientos son producidos con igual frecuencia por un cuerpo fructífero. Un sistema bipolar puede ser representado como sigue: Figura 5.

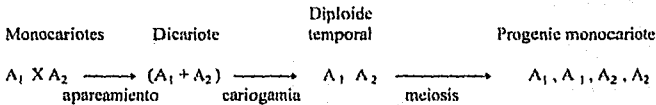
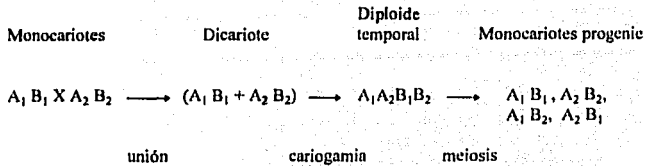


Figura 5. Sistema de apareamiento bipolar.

- b) **Sistema de apareamiento tetrapolar.** La unión está determinada principalmente por dos factores de compatibilidad de dos series A y B, las cuales son segregadas en forma independiente en la meiosis. Así se presentan cuatro en vez de dos tipos de compatibilidad producidas con igual frecuencia por un cuerpo fructífero. Las etapas principales para este sistema de compatibilidad puede ser representado como sigue: Figura 6 (Raper, 1978; Chang, 1982).



**Figura 6. Sistema de apareamiento tetrapolar.**

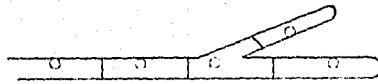
### 2.3.5.3 Modelo sexual en hongos comestibles cultivados.

*Pleurotus ostreatus* presenta un tipo de sexualidad heterotállica tetrapolar (Chang, 1982).

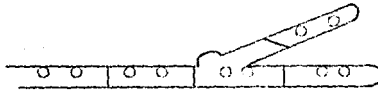
### 2.3.5.4 Compatibilidad tetrapolar.

*Pleurotus ostreatus* presenta incompatibilidad tetrapolar; es decir, de un cuerpo fructífero se obtienen 4 tipos de esporas con dos factores A y B. El micelio puede interactuar para formar un dicariote, caracterizado por presentar conexiones de grapa o fibulas y después de una división nuclear conjugada se obtienen los factores de compatibilidad A y B. En la población natural de *Pleurotus ostreatus* se calcula la existencia de al menos 63 factores A y 190 factores B. Cada combinación de un factor A con uno B representa un tipo de cruzamiento. Pueden ser esperados  $63 \times 190 = 11\ 970$  tipos de cruzamientos. A continuación se presentan las diferencias entre una hifa monocariote y una dicariote.

En algunas cepas de *Pleurotus ostreatus* las células dicarióticas se reconoce macroscópicamente por su velocidad de crecimiento y en otros casos es absolutamente indispensable un control microscópico: Figura 7 (Eger, 1978a; Eger, 1978b).



a) Hifa monocariote (uninucleada)



b) Hifa dicariote (binucleada y con fibrillas)

Figura 7. Tipos de hifas: monocariote y dicariote.

### 2.3.6 Fructificación bajo condiciones naturales.

En época de lluvia las esporas de *Pleurotus ostreatus* germinan sobre la corteza de un tronco (si este no ha sido invadido por otro microorganismo) el micelio joven crecerá y penetrará la madera. Si la corteza se deshidrata debido a cambios de clima, el micelio se extenderá principalmente hacia las capas profundas de la madera, donde existe oscuridad y el  $\text{CO}_2$  se acumula por la falta de intercambio de aire. Aunque el micelio esté rodeado por materia orgánica, el alimento no está disponible, éste debe ser obtenido por ruptura de macromoléculas. Al expandirse el micelio, aumentan las reservas de alimento y agua.

Si en alguna parte de la corteza existiera un agujero muy pequeño, un débil resplandor de rayo de sol llega a las hifas, que están adaptadas a la continua oscuridad, reaccionarán ante los nuevos estímulos y formarán un agregado de hifas, esto se facilita por el aumento de  $\text{O}_2$  y consecuente disminución de  $\text{CO}_2$  (intercambio de aire por el agujero). Como el estímulo de luz es repetido cada día, el agregado crece continuamente hacia el origen de luz, forman un cuerpo delgado de hifas densamente entretrejidas que penetran toda la madera. El aire fresco con bajo contenido de  $\text{CO}_2$ , la elevada humedad y temperatura templada sobre los cuerpos estimulan la formación de lametas y basidiosporas (Eger, 1978a).

## 2.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Pleurotus ostreatus*.

La importancia de los hongos como fuente de alimento ha aumentado debido a sus excelentes cualidades sensoriales. De hecho las virtudes de los hongos, radican en otro punto, los más delicados exhalan un perfume o poseen un sabor al que es difícil resistirse. Es precisamente, este sabor lo que los hace tan buscado desde hace siglos existiendo en cuanto a preferencia, gran diferencia de un país a otro. Los actuales especialistas en nutrición se han dado cuenta de que los alimentos totalmente insípidos son imposibles de digerir (Alcántara, 1990 y Becker, 1992).

*Pleurotus ostreatus* (Jacq ex Fr.) Kummer, es conocido también como el hongo ostra, es un hongo saprófito (del griego *sapros*, podrido y *phyton*, planta) que destruye la madera o se desarrolla sobre materia orgánica descompuesta, se extiende fácilmente en zonas templadas. El pileo o sombrero al crecer opone resistencia a un lado; la parte exterior es dura, con forma de lengua o espátula y después decae. Un cuerpo maduro crece de 5 a 15 cm. es de color gris, gris-café, o gris-pizarra. Las lamelas son decurrentes de coloración blanquiza o gris. El estípite es corto, excéntrico o lateral. Las esporas son transparentes cuyo tamaño oscila de 8 a 12/3 a 4  $\mu\text{m}$ . El depósito de las esporas es blanco o fila-gris. Se conoce que la esporada causa enfermedad alérgica a las personas sensibles que están en contacto con ellas. Las esporas se expanden con facilidad por lo tanto el aire debe ser filtrado y se debe proveer a los trabajadores de mascarillas para evitar la respiración de esporas.

Según las condiciones de cultivo, el basidiocarpo puede o no presentar pie, cuando se cultiva en camas, desarrollan pies centrales, mientras que en superficies verticales forman pies laterales o excéntricos (Zadrazil, 1974; Eger, 1978b).

En México *Pleurotus ostreatus* se identifica con el nombre de "seta", "hongo ostión", "oreja blanca", "oreja de palo", "oreja de izote" y "hongo de bagazo" (Alcántara, 1990).

## 2.5 CULTIVO

### 2.5.1 INDUCCIÓN DE PRIMORDIOS.

Para obtener en forma rápida y abundante la formación de primordios, el micelio tiene que ser expuesto a la luz en el momento de su mayor sensibilidad a la luz (cuando el micelio ha penetrado en todo el sustrato). Son importantes la cantidad y calidad de la luz. *Pleurotus ostreatus*, requiere luz de longitud de onda corta de 520 nm para fructificar y para la expansión del pileo (fuente luminosa con una alta porción de luz azul). La intensidad de luz y el importe (intensidad de luz por duración de luz) son críticas para la iniciación de la fructificación; hay un requerimiento mínimo y óptimo, más allá de los cuales la formación de primordios es inhibida rápidamente.

Para un mejor intercambio de aire es necesario perforar las bolsas de polietileno en las que se cultiva. Para prevenir la deshidratación, el cultivo debe ser puesto dentro de un cuarto húmedo, para inducir el desarrollo de los esporoforos y la temperatura también debe ser controlada (Eger, 1978a).



## 2.5.2 PREVENCIÓN DE CONTAMINACIÓN.

Los cuartos de incubación, para el crecimiento de micelio e inducción de primordios deben estar separados por medio de varias puertas para mantener una mayor asepsia.

Las bolsas de polietileno proveen de suficiente protección contra la contaminación si son tratadas superficialmente con insecticidas.

Los cultivos que ya tienen primordios deben ser removidos y puestos bajo condiciones que favorezcan la fructificación.

De cada descendencia debe ser guardado un cultivo bajo condiciones estériles para preservar la cepa original (Eger, 1978a).

## 2.5.3 NECESIDAD DE UN CONTROL.

La fructificación es un proceso sensible que puede ser afectado por diversos factores, aun bajo las mejores condiciones que ofrece un laboratorio, no pueden ser registradas todas las posibles equivocaciones. Por eso, es mejor usar una descendencia (conocida en experimentos previos) como patrón o estándar. Varias muestras patrón deben ser corridas en cada experimento. La fructificación de los estándares nos indica si las condiciones son las adecuadas o no.

El estándar, si es una variedad comercial nos permitirá elaborar un mejor juicio del experimento; por ejemplo, la apariencia de un cuerpo fructífero puede deberse a las condiciones del cultivo o a la genética del organismo (Eger, 1978a).

## 2.5.4 PROBLEMAS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE *Pleurotus*

a) Los desechos agrícolas pueden contener una gran variedad de productos químicos en diversas concentraciones que pueden afectar el crecimiento de los hongos o acumularse en los cuerpos fructíferos poniendo en peligro la salud de los consumidores.

b) Una gran cantidad de basidiosporas, es liberada al aire pudiendo amenar la salud de los trabajadores de las granjas de hongos, especialmente de aquellos que al trabajar no toman medidas de protección.

c) Dos tipos de descendientes de *Pleurotus* son cultivados: Las cepas americanas fructifican en el rango de 4 a 27°C, mientras que algunas europeas no producen esporoforos arriba de 15°C.

d) Algunos esporoforos cesan su crecimiento si son transferidos a condiciones de temperatura elevada.

e) La apariencia de los esporoforos depende en gran medida de la temperatura y la luz. A temperaturas elevadas y baja intensidad de luz, se obtienen cuerpos fructíferos pálidos, blanqueados por la falta de luz, frágiles y como embudo. El aroma y sabor del hongo que está creciendo a bajas temperaturas y alta intensidad de luz difieren de los "blanqueados".

Por lo tanto, las condiciones deben ser controladas cuidadosamente para obtener calidad comparable por todo el año. El mercado requiere buena apariencia, empaques y almacenaje de calidad; una rápida comercialización porque el consumidor está interesado por un producto de buen sabor, olor y textura, digestivo y con un alto valor nutritivo (Eger, 1978a).

### **2.5.5 VENTAJAS DE CULTIVACIÓN DE *Pleurotus* SOBRE OTROS HONGOS: *Agaricus* y *Volvariella*.**

a) La mayor parte de las especies de *Pleurotus* crecen radialmente sobre el sustrato y éste no requiere tratamiento previo (Jandaik, 1976).

b) Fructifican sobre desechos orgánicos con bajo contenido de nitrógeno produciendo cuerpos fructíferos con alto contenido de nitrógeno.

c) *Pleurotus* sp se caracteriza por un crecimiento micelial rápido que permite colonizar rápidamente el sustrato (Jandaik, 1976).

d) Toleran altos niveles de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, lo cual ayuda a excluir a los microorganismos sensibles al CO<sub>2</sub> que compiten por el mismo sustrato (Zadrazil, 1975).

e) Considerando la eficiencia biológica y el tiempo necesario para completar un ciclo productivo, se dice que *Pleurotus ostreatus* produce mayor cantidad de cuerpos fructíferos que *Agaricus* (Bano y Rajarathnam, 1982).

f) El sustrato (paja) tiene mayor digestibilidad en pruebas realizadas in vitro en rumen después de cosechar los cuerpos fructíferos (Chang, 1979).

g) Los requerimientos de temperatura para la fructificación, presentan un amplio rango de temperaturas, desde 18 hasta 30°C .

h) El cuerpo fructífero en general contiene más fibra cruda y es menos perecedero a temperatura ambiente comparado con *Agaricus* o *Volvariella* (Rajarathnam y Bano, 1983).

## 2.5.6 ENFERMEDADES Y PRESENCIA DE PLAGAS EN LOS HONGOS COMESTIBLES .

### a) Enfermedades bióticas.

Las enfermedades bióticas son causadas por bacterias, micoplasmas o virus, sin embargo este tipo de enfermedades no son comunes en los hongos o al menos no han sido reportadas como tales desde el punto de vista económico para el cultivo.

### b) Enfermedades abióticas.

Este tipo de enfermedades es el causado por la falta de nutrientes específicos para el desarrollo de los hongos o por las variaciones ambientales del entorno donde se cultiva el hongo.

En este sentido los principales problemas se presentan por efecto de una deficiencia en ventilación, lo que influye directamente en la concentración de CO<sub>2</sub>, en variaciones en la humedad relativa o en los efectos del exceso o falta de luminosidad.

El exceso de CO<sub>2</sub> en la atmósfera que rodea al hongo produce que estos desarrollen estípite más largos. La falta de humedad, además de reducir el rendimiento, afecta el desarrollo de los carpóforos, los cuales pueden presentar deformaciones. La iluminación produce variaciones en la pigmentación de los carpóforos. Cuando la humedad es excesiva, de tal manera que moja demasiado los cuerpos fructíferos, estos presentan un aspecto blando, aguado y amarillento (Sánchez, 1993b).

### c) Presencia de plagas.

Existe toda una entomofauna asociada al cultivo de *Pleurotus*, la mejor manera de evitarla es aislando los cuartos de incubación y fructificación del exterior, lo cual es difícil para la sala de fructificación, ya que el hongo requiere de ventilación constante lo que hace extremadamente difícil mantener el lugar libre de insectos, hormigas, cucarachas, roedores (a nivel industrial) y de pájaros (en el caso de cultivo a la intemperie).

En estos casos es necesaria la limpieza constante de anaqueles y paredes con jabón, cloro o desinfectante para matar huevecillos y larvas. Para el control de estas plagas e insectos asociados, se recomienda el aislamiento de los locales y la colocación de trampas. Dos trampas que funcionan muy bien son: 1) tiras de polietileno untadas de aceite comestible y colocadas a través de los estantes o 2) recipientes plásticos o de vidrio con un líquido atrayente como cerveza o miel de cacao, a la cual se le pone en la boca un embudo con el orificio muy pequeño, de tal manera que el insecto pueda entrar pero no salir. Existen trampas comerciales para insectos voladores. Otra forma adecuada resulta mezclar insecticidas con alimento atrayente. Es posible usar los insecticidas para uso ambiental, por ejemplo, placas sheltox y como un último recurso las fumigaciones con piretroides, un remedio muy eficaz es el uso de aspersiones de infusión de raíz de flor de muerto, también conocida como compazúchil *Tagetes erecta* (Sánchez, 1993b).

## 2.6 CULTIVO DE *Pleurotus* A ESCALA COMERCIAL.

El cultivo de *Pleurotus* con fines comerciales es un proceso sencillo, con una tecnología no sofisticada que involucra el mantenimiento de las condiciones climáticas favorables para el desarrollo del hongo. La humedad, la ventilación, la temperatura y el pH del sustrato son los factores primordiales que se deben vigilar y mantener constantes para optimizar la producción.

Los materiales que se recomiendan para el crecimiento del hongo son variados: pajas, bagazos, cáscaras, cortezas, tocones, mazorcas, aserrín, etcétera; de los cultivos de mayor importancia en México que son: maíz, trigo, frijol, sorgo, caña de azúcar, café y frutales (Sánchez, 1993b).

Diferentes grupos de investigadores se han interesado en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* a nivel laboratorio utilizando como sustrato diferentes tipos de materiales lignocelulósicos; pajas de casi todo tipo de cereales como trigo, arroz, avena, cebada, centeno, mijo, maíz (e inclusive olote), aserrines de varias clases de maderas, y desperdicios de la industria papelera, entre otros (Bloek, Tsao y Han, 1958; Jablonsky, 1975; Omori, 1974; Keneshiro, 1977; Omori, Kanno y Yoshida, 1977).

La problemática derivada del cultivo intensivo del hongo se restringe básicamente al control de las condiciones ambientales, a la presencia de insectos y a las contaminaciones. El descuido en las condiciones de cultivo propicia la aparición de deformaciones en el crecimiento.

El tratamiento térmico del sustrato es primordial, su función es eliminar o inhibir la mayoría de los organismos que pueden competir con el hongo por el sustrato.

El crecimiento de este género está supeditado a ciertos factores como son: la temperatura, la humedad del ambiente, la humedad del sustrato, el pH, las concentraciones de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y la luz. Las condiciones más adecuadas de estos factores dependen del tipo de desarrollo que se busca del hongo, si es para crecimiento del micelio o para propiciar la fructificación (Sánchez, 1993b).

El micelio de *Pleurotus* crece bien en un amplio rango de temperaturas que va desde arriba de 10°C hasta 40°C como límite superior; sin embargo, la temperatura óptima oscila alrededor de los 25°C para la mayoría de las especies. Para *Pleurotus florida* y *P. ostreatus* se registran óptimas de 30°C. La temperatura de fructificación varía con la especie; las especies tropicales de *Pleurotus* fructifican bien entre 20 a 30°C. Es de hacer notar que el cuidado de una temperatura adecuada para el desarrollo del hongo incide directamente en el rendimiento obtenido (Kurtzman y Zadrzil, 1989; Sánchez, 1993b).

Se sabe que la humedad relativa es un factor sumamente importante en el desarrollo de un hongo. La falta de humedad ambiental inhibe la fructificación. La literatura reporta valores entre 60 a 95% para la mayoría de las especies de *Pleurotus*; sin embargo para el caso específico de *P. ostreatus* se ha observado que una humedad de 80 a 85% es mejor (Chang y Hayes, 1989).

Desde 1935 se comprobó que el suministro de luz era necesario para promover la fructificación de *Pleurotus*, sin embargo las primeras recomendaciones sobre la cantidad de luz que se requería dieron lugar a confusiones porque la fructificación depende de la naturaleza de la fuente luminosa que se tenga. En general, los hongos requieren luz de longitudes de onda corta (cargado hacia el color azul del espectro). Si la luz se proporciona con lámparas fluorescentes, que son ricas en luz azul, la luz que se debe aportar a los hongos debe ser en cantidad suficiente para que uno pueda leer material impreso, aproximadamente 150 a 200 lux (Sánchez, 1993b).

La concentración de CO<sub>2</sub> es muy importante para el desarrollo de *Pleurotus*. Una concentración relativamente alta de 20 a 25% es útil para propiciar el crecimiento del micelio. Sin embargo concentraciones superiores al 0.6% inhiben la formación de primordios. Por ello, cuando se desea producir hongos de manera comercial, es necesario implementar un buen sistema de ventilación en la sala de fructificación, de tal manera que se elimine constantemente el CO<sub>2</sub> formado por la respiración del propio hongo. Una ventilación deficiente se manifiesta en deformaciones del cuerpo fructífero. Esto puede ser, desde un ligero alargamiento del estípite, la no formación del pileo o ambas cosas. A continuación se resumen los valores óptimos para el desarrollo micelial y la fructificación de *Pleurotus spp* Tabla 1 (Bello, 1993; Kurtzman y Zadrzil, 1989; Sánchez, 1993b).

Tabla 1. Valores óptimos de los factores que influyen en el crecimiento de *Pleurotus spp*.

Factor	Crecimiento micelial	Fructificación
• Temperatura	25-33°C	28°C
• Humedad relativa	Baja humedad	85%
• Humedad del sustrato	70%	50%
• pH del sustrato	6.0-7.0	6.5-7.0
• Concentración de CO <sub>2</sub> (buena ventilación)	20-25% (aire normal)	< 0.6% (buena ventilación)
• Luminosidad	Obscuridad	150-200 lux (suficiente para leer)

En algunas regiones, donde las condiciones climáticas son cercanas a las mencionadas anteriormente y donde los cambios climáticos no son muy drásticos ni frecuentes, es posible cultivar los hongos a la intemperie, aprovechando la temporada de lluvia y colocando el sustrato (invadido por el micelio) bajo la sombra de los bosques. Fuera de la época de lluvia no es posible cultivar dichos hongos a la intemperie; además, el número de plagas que entran en contacto con los hongos es mayor (insectos, hormigas, cucarachas, roedores e incluso pájaros (Sánchez y Calvo, 1993; Sánchez, 1993b).

## 2.7 MEJORAMIENTO GENÉTICO.

Hasta el momento el mejoramiento genético a nivel internacional ha sido propuesto por diferentes grupos de investigación así Chang en 1982 plantea realizarlo por medio de la hibridación, la cual se puede llevar a cabo por diferentes caminos:

a) Aplicación de auxótrofos. Los cuales pueden ser obtenidos naturalmente o inducidos por mutagénesis. Los auxótrofos contrastantes pueden ser apareados y los productos pueden ser protegidos por hibridación en un medio mínimo (Chang, 1982).

b) Uso de marcadores resistentes. Los mutantes resistentes antimetabolitos han sido sugeridas como una alternativa para obtener auxótrofos para los programas de mejoramiento genético. Las esporas o fragmentos de hifas tratadas que puedan crecer en un medio que contiene una cierta concentración inhibidora del metabolito se puede considerar que posee a este marcador. Complementariamente las cepas resistentes pueden ser sembradas conjuntamente e hibridadas y transferidas a un medio que contiene los dos metabolitos para los que fueron resistentes (Elliott, 1979; Chang, 1982).

c) Fusión de protoplastos. Una de las principales barreras para la reproducción sexual es la imposibilidad de cruzar dos cepas seleccionadas, por factores de incompatibilidad. Los protoplastos pueden ser obtenidos haciendo una digestión enzimática de la pared celular en presencia de un estabilizador osmótico y se puede inducir a su fusión en presencia de polietilenglicol. Después de un tiempo relativamente corto, los protoplastos pueden regenerar su pared celular y propagarse como células o hifas normales, esta técnica puede ser ampliamente utilizada para la obtención de cruza interespecie e intergenéricas o cruza entre algunos organismos que normalmente no pueden ser cruzados (Kao y Michayluk, 1974; Peberdy, 1980; Chang, 1982).

Con la misma finalidad Eger ha propuesto:

a) Selección de cepas resistentes a productos químicos y a temperaturas extremas. Las esporas se siembran en agar o en diversos sustratos conteniendo altas concentraciones de un producto químico especial y son incubadas a temperaturas extremas, así el 99 a 99.9% de esporas no germinará; pero entre las sobrevivientes se encuentran los individuos resistentes, que pueden ser cruzadas con otras cepas resistentes, para propiciar un mejoramiento genético.

b) Hibridación de cepas monocariotes fructificantes de *Pleurotus florida* para obtener dicariotes fértiles bajo condiciones estándar.

c) Cultivo de variedades que fructifican a elevadas temperaturas. Una buena probabilidad de obtener genotipos mejorados es por cruzamiento de descendientes de *Pleurotus* de diferentes orígenes, sensibles o no a altas temperaturas.

d) Cultivo de variedades asporógenas. Son posibles las variedades con cuerpos fructíferos sin esporas; por ejemplo el dicariote sin esporas "F 42 X 11" produce esporoforos completamente aceptables en apariencia, sabor y productividad. Se cree que un gen en *Pleurotus ostreatus* es responsables de la producción de esporas. Para producir variedades sin esporas el gen es bloqueado por mutación química.

e) Ventajas de la producción de híbridos. Las variedades más prósperas de arroz, maíz y otras plantas de cosecha son híbridos. Producir variedades híbridas de *Pleurotus* es mucho más fácil que en plantas de cosecha. Cada monocariote contiene solo un juego de genes en su núcleo. El único juego de gen puede ser propagado a voluntad. Una vez conocida su constitución genética, ésta puede ser cambiada con otro monocariote conocido para formar un dicariote de las características deseadas. Los híbridos frecuentemente dan más altas utilidades y sobreabundante desarrollo, además de proveer una protección contra hurto de otros productores de hongos (por la heterogenética de su núcleo).

f) Variedades comerciales marcadas con mutantes auxótrofos. La cepa solo crecerá en el sustrato suplementado con un aminoácido especial, vitaminas o pirimidina, evitando de esta manera el uso no permitido de la cepa (Eger, 1978n).

g) Producción de haploides, lo cual se puede lograr por tres caminos:

1. Método quirúrgico; un núcleo puede ser eliminado del dicariote y dar un nuevo monocariote (neo haplonte). La operación tiene que realizarse bajo el microscopio con la ayuda de un micromanipulador y solo unas cuantas células sobreviven.

2. Dedicariotización química; es la producción de neohaplontes por el uso de sustancias químicas sumamente tóxicas. En este caso, también solo un neohaplonte es recuperado, el cual corresponde al núcleo padre que es más resistente a las sustancias químicas, aunque algunas sustancias dan neohaplontes dañados.

3. Dedicariotización por agitación; se observó que el cultivo de micelio dicariote de *Pleurotus ostreatus* en un medio líquido al ser agitado a una cierta frecuencia se transforma a micelio monocariótico (Eger, 1978b)

h) Dedicariotización química. Posteriormente con un método nuevo y delicado fue posible separar sin daño los dos núcleos de un dicariote, resultando dos tipos de neo haplontes con bajo desarrollo micelial, pero si se cruza con genes de dicariotes sin esporas, las mutaciones perjudiciales pueden ser compensadas para obtener dicariotes de desarrollo normal pero con cuerpos fructíferos sin esporas. Este nuevo método es adecuado para el crecimiento de la descendencia sin esporas, ya que evita se presenten las reacciones alérgicas en las personas susceptibles que manejan el cultivo y además de impedir la producción de la variedad del hongo sin autorización de uso (Eger, 1978b; Eger y Lcal, 1978).

En México, Sobal y Martínez-Carrera reportan una investigación sobre el potencial de entrecruzamiento de diferentes cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*, aisladas a partir de diversos sustratos. En el cual, se estudiaron 6 cepas de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. aisladas a partir de madera en descomposición, pulpa de café y troncos vivos de higuera (*Ricinus communis* L.) palo mulato (*Bursera simaruba* Sarg.) e izote (*Yucca elephantipes* Regel). Se aislaron micelios monospóricos de cada cepa, para determinar sus clases de incompatibilidad. Posteriormente, se entrecruzaron los tipos de apareamientos de cada cepa, empleando un juego representativo de monospóricos. Se encontró que las cepas tienen un alto potencial de entrecruzamiento. Esta investigación abre la posibilidad de establecer líneas de selección de cepas, ya que estas tienen gran capacidad para entrecruzarse y una amplia diversidad genética y fisiológica para adaptarse a diversas condiciones y sustratos, con la capacidad de interactuar en forma silvestre para formar híbridos naturales (Sobal y Martínez-Carrera, 1988).

Recientemente fue estudiado por primera vez, el cultivo de una cepa silvestre mexicana de *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo; fue caracterizado su micelio macro y microscópicamente, calculando también su eficiencia biológica (Acosta-Urdapilleta, Bautista, Mora, López, Portugal y Bustos, 1994).

Por otra parte, se ha estudiado la degradación de desechos lignocelulósicos in vitro. La digestibilidad de diversos tipos de sustratos con celulosa en rumiantes es muy baja por la inter-relación lignina-celulosa. El objetivo de dicho estudio fue mejorar la digestibilidad y el valor alimenticio de plantas residuales por incremento de utilidad de carbohidratos (al descomponer los complejos ligno-celulósicos con el cultivo de cepas de *Pleurotus*) más que por la producción de proteína del hongo. El grado de acumulación de sustancias fácilmente solubles como el azúcar y aminoácidos determinó el grado de digestibilidad. De esta manera se disminuye la contaminación ambiental al frenar la quema de desechos agroindustriales y se favorece la alimentación animal, nutricional y económicamente (Rajarithnam y Bano, 1983; Leal, 1980; Ramírez, 1989; Leal y Ramírez, 1990; Alcántara, 1990).

*Pleurotus* es uno de los géneros de hongos comestibles más ampliamente distribuidos y cultivados mundialmente. Se sitúa en segundo lugar de producción mundial superado solo por *Agaricus*. En el 5° Congreso Nacional de Micología fueron presentadas las áreas de investigación que se están desarrollando a nivel nacional:

- a) Evaluación de la eficiencia biológica sobre diferentes sustratos (Hernández, Sánchez y Calvo, 1994).
- b) Efecto de la temperatura sobre la fructificación y la eficiencia biológica (Rodríguez, Soto-Velazco, Alonso, Villaseñor, Camino y Guzmán-Dávalos, 1994).
- c) Producción de inóculo líquido para su cultivo comercial (Sánchez y Calvo, 1994).
- d) Adaptación del cultivo comercial a zonas rurales (Martínez-Carrera, Morales, Martínez, Sobal y Larqué, 1994).



e) Mejoramiento genético por simple entrecruzamiento (Salmones, Mata y Guzmán, 1994).

f) Aspectos fisiológicos con medios definidos (Barba, 1994).

g) Conservación de capas con nitrógeno líquido (Lara-Herrera y Mata, 1994).

## 2.8 VALOR NUTRITIVO DE LOS HONGOS.

Tradicionalmente se ha considerado a los hongos como un alimento de alta calidad, con sabor y textura apreciable y sobre todo por su alto valor nutritivo. Actualmente los hongos juegan un papel importante en la alimentación del hombre al igual que la carne, pescado, frutas y vegetales.

El mayor interés en el valor nutritivo de los hongos es la cantidad y calidad de las proteínas. El contenido promedio de proteína es de 3.5 a 4% (base húmeda) y de 30 a 50% (base seca). En comparación con el contenido de proteína de otros alimentos, los hongos tienen el doble que los vegetales (excepto soya, chícharos y lentejas) y cuatro a doce veces mayor que las frutas; sin embargo, es inferior a carne, pescado, huevo y lácteos.

La digestibilidad de la proteína de los hongos es un factor muy importante para determinar su valor dietético. Numerosos estudios en ratas y humanos muestran que entre el 71 y el 90 % de la proteína de los hongos puede ser digerida, mientras que para la carne puede serlo en un 99%.

La composición proximal de algunas especies de hongos comestibles, entre ellos *Pleurotus ostreatus* se presenta en la Tabla 2 (Calvo, 1993a).

No solo el contenido total de proteína es importante para determinar el valor nutritivo de los hongos y de cualquier otro alimento, sino también la proporción relativa de los aminoácidos, principalmente los esenciales. Los hongos contienen todos los aminoácidos esenciales que necesita el hombre para su nutrición. El contenido es similar al de la carne, aunque inferior en isoleucina, leucina, lisina e histidina. La metionina y cisteína parece ser más baja en los hongos que en la carne, pero similar a la proteína de los vegetales. Los hongos poseen mayor contenido de lisina y triptófano.

Los hongos comestibles son una fuente de vitaminas, incluyendo tiamina (Vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (Vitamina B<sub>2</sub>), ácido pantoténico, niacina, biotina, ácido ascórbico (Vitamina C), entre otros. Se ha detectado en *Pleurotus ostreatus* la presencia de ergosterol, que es precursor de la vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol a través de reacciones fotoquímicas. A partir de 8.5 Kg de hongos frescos se obtienen 220 mg de ergosterol (0.028% base seca). Contienen cantidades apreciables de minerales como potasio, fósforo, cobre y hierro entre otros; además, es un alimento bajo en grasa del orden de 0.1 a 0.3% en peso fresco.

Los hongos además de ser un excelente alimento nutricional, poseen cualidades medicinales. Se ha investigado los efectos antitumorales de diversas especies de hongos comestibles como *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula* y *Pleurotus ostreatus*. Los estudios indican que los compuestos químicos responsables de estos efectos son polisacáridos. Un glucano ha sido aislado de *Pleurotus ostreatus*, este muestra marcada actividad antitumoral en una dosis de 0.1 mg/ Kg (Calvo, 1993a).

**Tabla 2. Composición proximal de algunas especies de hongos comestibles (% peso seco).**

Especie	Humedad *	Proteína cruda	Grasa cruda	Fibra cruda	Cenizas
<i>Agaricus bisporus</i>	84.4	29.4	4.9	9.2	8.5
<i>A. campestris</i>	89.7	33.2	1.9	8.1	8.0
<i>Auricularia sp.</i>	89.1	4.2	8.3	19.8	1.7
<i>Boletus edulis</i>	87.3	29.7	3.1	8.0	7.5
<i>Flamulina velutipes</i>	89.2	17.6	1.9	3.7	7.4
<i>Lentinus edodes</i>	90.0	15.5	6.5	7.7	5.4
<i>Pleurotus eous</i>	92.2	25.0	1.1	12.0	9.1
<i>P. florida</i>	91.5	27.0	1.6	11.5	9.3
<i>P. ostreatus</i>	82.3	20.5	1.9	8.1	8.0
<i>P. sajor-caju</i>	90.1	26.6	2.0	13.3	6.5
<i>Volvariella diplasia</i>	90.4	28.5	2.6	17.4	11.5
<i>V. volvacea</i>	89.1	25.9	2.4	9.3	8.8
<i>Cookeina sulcipes</i>	79.9	35.3	2.9	14.3	10.4

(\*) % Peso fresco

## 2.9 ALTERNATIVAS EN LA CONSERVACIÓN DE HONGOS COMESTIBLES (*Pleurotus ostreatus*):

En la mayoría de los casos los hongos se venden en fresco, lo cual representa un problema. Es necesario considerar un método de conservación viable, técnica y económicamente, para mantener las características organolépticas durante su almacenamiento desde su cosecha hasta el consumidor. Los hongos al igual que las frutas y vegetales, son perecederos y después de la cosecha suceden cambios que los hacen inaceptables para el consumo humano si no se conservan adecuadamente. El principal factor que promueve cambios indeseables en gran parte de los alimentos frescos durante su almacenamiento es el contenido de humedad; los hongos presentan de 85 a 95% en promedio, por lo que son muy susceptibles a cambios, entre ellos, la pérdida de nutrientes y deterioro del hongo. Un factor primordial del cual depende la vida de anaquel de los hongos es la madurez de cosecha; se habla de dos tipos de madurez: biológica y comercial. La madurez biológica por ejemplo para *Pleurotus ostreatus* es cuando el borde del pileo se encuentra ensortijado hacia arriba y comienza a dispersar sus esporas, la madurez comercial es más temprana, es decir, cuando el hongo es biológicamente inmaduro debe ser cosechado.

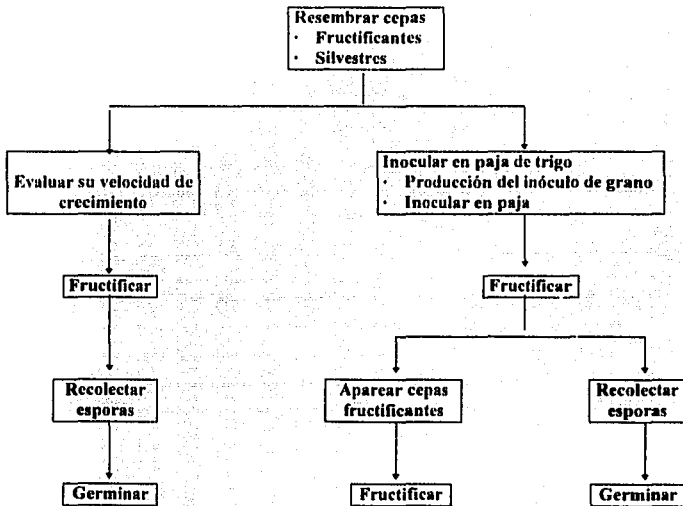
Se han ideado numerosas alternativas para la conservación de los hongos, en las que se incluye: la congelación, el enlatado, el uso de atmósferas controladas ( $\text{CO}_2$  conocido como hielo seco,  $\text{CO}$  o  $\text{N}_2$  a  $0^\circ\text{C}$ ), la refrigeración y el secado, estos dos últimos con mayores ventajas de conservación a corto y a largo plazo, respectivamente. Para *Pleurotus*, la refrigeración a temperaturas de  $4^\circ\text{C}$  (cuarto frío) en bolsas de plástico resultan ser más eficientes para un período de conservación de 8-10 días y el secado en túneles con una vida de anaquel mucho más larga.

El almacenamiento de los hongos en bolsas de plástico es efectivo para reducir la pérdida de humedad. Sin embargo las bolsas deben ser perforadas para evitar la sofocación de los hongos. El efecto de la perforación es estabilizar el equilibrio entre  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  y de esta manera reducir la tasa de respiración y la pérdida de humedad (Calvo, 1993b).

## CAPÍTULO III

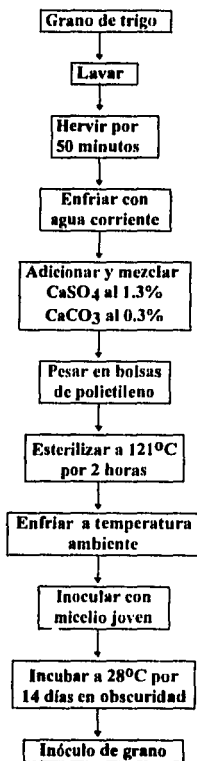
## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 DIAGRAMA GENERAL.

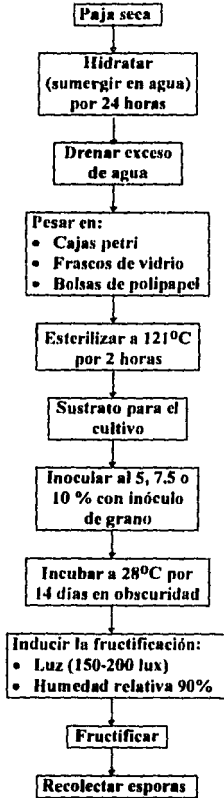


### 3.1.1 DIAGRAMAS ESPECÍFICOS

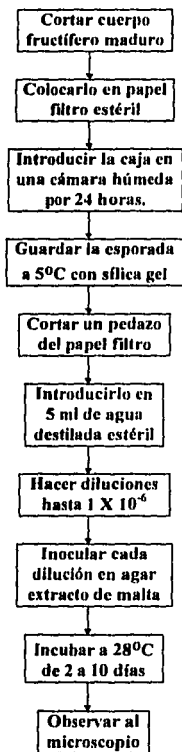
#### 3.1.1.1 Diagrama para preparar inóculo de grano



### 3.1.1.2 Diagrama para la preparación e inoculación de la paja de trigo para obtener cuerpos fructíferos.



### 3.1.1.3 Diagrama para la germinación de esporas.



**Nota:** Todo el proceso de germinación de esporas se realiza bajo condiciones asepticas.



### 3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS.

#### 3.2.1 Material biológico.

Las cepas monocarióticas de *Pleurotus ostreatus* utilizadas para el presente estudio, forman parte del cepario del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la U.N.A.M. Las cepas P 400 a P 417 así como los componentes monocariotes de la cepa P 22, fueron obtenidas del cepario de la Doctora Eger en Alemania Federal. El resto de las cepas fueron obtenidas en el propio Departamento (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1: Monocariotes utilizados para el presente estudio.**

CEPAS MONOCARIOTES	
FRUCTIFICANTES	SILVESTRES
P 400	P 403
P 405	P 404
P 406	P 411
P 407	P 412
P 408	<b>PROGENIE DE LA CEPA P 11</b>
P 409	
P 410	P 11.1
P 415	P 11.2
P 416	P 11.3
P 417	P 11.4
	<b>COMPONENTES MONOCARIOTES DE LA CEPA P 21</b>
	P 21-1
	P 21-2
<b>COMPONENTES MONOCARIOTES DE LA CEPA P 22</b>	
P 22-1	
P 22-2	
<b>CEPA DICARIOTE CONTROL</b>	
P 14	

Se utilizó como cepa control una cepa que se emplea para la producción a nivel comercial de *Pleurotus*, esto se hizo con el objeto de observar si las cepas monocariotes pueden ser utilizadas para la producción comercial de este hongo.

**Tabla 2: Características de las cepas monocarióticas de *Pleurotus ostreatus* indicadas por los diferentes donadores.**

CEPAS	CARACTERÍSTICAS
P 400 P 407 P 408 P 409 P 410 P 415 P 416 P 417	Monocariotes fructificantes con vigoroso crecimiento miceliar.
P 405 P 406	Monocariotes fructificantes con reducida producción de esporas.
P 411 P 412	Monocariotes silvestres con reducida producción de esporas.
P 403 P 404	Monocariotes silvestres.
P 11.1 P 11.2 P 11.3 P 11.4	Progenic de la cepa P 11.
P 21-1 P 21-2	Componentes monocariotes de la cepa P 21.
P 22-1 P 22-2	Componentes monocarióticos de la cepa asporógena P 22, la cual fue obtenida por manipulación genética.
P 14	Híbrido obtenido por el Dr. Leal, que presenta vigoroso crecimiento y facilidad para producir cuerpos fructíferos.

### **3.2.2 Material de laboratorio.**

- Agitadores de vidrio
- Asa de inoculación
- Bolsas de polipapel de 10X10, 15X20, 20X60 y 25X40 cm.
- Bolsas de polietileno
- Cajas petri desechables
- Cajas petri de vidrio
- Clips
- Cubre objetos y porta objetos
- Frascos de vidrio
- Frascos viales de 5 ml.
- Grudillas
- Horador de 0.4 cm. de diámetro
- Hule espuma
- Jeringa de llenado continuo
- Ligas
- Matraces Erlenmeyer de 100, 500 y 1000 ml.
- Mechero
- Papel aluminio
- Papel filtro ( Whatman No. 1)
- Papel manila
- Pinzas
- Pipeta automática de 100 µl.
- Puntas para pipeta automática
- Tijeras
- Tubos de ensaye

### **3.2.3 Reactivos.**

#### **3.2.3.1 Medios de cultivo.**

Medio agar extracto de malta:

- Extracto de malta ( Maltex "N". Complementos alimenticios).
- Agar bacteriológico Bioxon.

#### **3.2.3.2 Reactivos generales.**

- Carbonato de calcio
- Cloruro de benzalconio (desinfectante)
- Granos de trigo

- Paja de trigo
- Sílica gel con indicador de humedad
- Sulfato de calcio

### **3.2.4 Equipo.**

- Autoclave vertical (Técnica Industrial Decovi)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Balanza granataria ( Ohaus)
- Campana de flujo laminar horizontal (Veco)
- Humidificador ultrasónico (Sumbeam)
- Incubadora (Felisa)
- Microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss)
- Refrigerador (Mabe)

### **3.3 METODOLOGÍA**

#### **3.3.1 MEDIO DE CULTIVO: AGAR EXTRACTO DE MALTA**

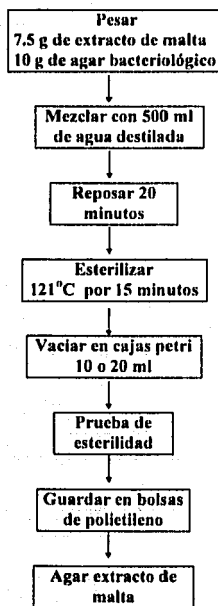
Para preparar 500 ml de medio extracto de malta agar, se pesaron 7.5 g de extracto de malta y 10 g de agar bacteriológico; se colocaron en un matraz Erlenmeyer de un litro. Se adicionaron gradualmente 500 ml de agua destilada, hasta disolver los reactivos en su totalidad. A continuación se tapó el matraz con hule espuma y papel aluminio y se dejó reposar durante 20 minutos. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C y 1.02 atm. de presión durante 15 minutos. El medio estéril se vació en cajas petri de plástico de 9 cm de diámetro (10 o 20 ml en cada caja). Una vez solidificado el medio se guardaron las cajas petri en bolsas de polietileno hasta el momento de ser utilizadas para evitar contaminaciones y deshidratación del medio. Diagrama 1 (Leal, 1980; Ramírez, 1989; Alcántara, 1990).

#### **3.3.2 RESIEMBRA DE CEPAS**

Las cepas deben ser sembradas en 20 ml de agar extracto de malta y una vez que su desarrollo micelial invade el medio totalmente se guardan en refrigeración a 5°C. Para su reutilización se resiembrar por triplicado, dos o cuatro cuadros de agar con micelio en cada caja petri con medio de extracto de malta y se incuban de 5 a 8 días a 28°C. De las cajas limpias (libres de contaminantes) se resiembrar nuevamente para obtener micelio joven. Con este procedimiento se aumenta la velocidad de crecimiento micelial al tener la cepa nuevamente nutrientes disponibles. Bajo estas condiciones se tiene una cepa lista para ser utilizada.

Posteriormente las cepas fueron resembradas por duplicado en cajas petri con 10 ml de agar extracto de malta e incubadas a 28°C durante 3 días para ser observadas al microscopio y comprobar que todas las cepas eran monocariotes.

**Diagrama 1. Preparación del medio de agar extracto de malta**



### 3.3.3 PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE GRANO.

Se conoce como inóculo de grano al crecimiento micelial obtenido en los granos estériles de algún cereal como trigo, centeno o mijo. El inóculo de grano se utilizó para sembrar la cepa deseada en un sustrato determinado (paja de trigo) y aumentar el número de puntos de inoculación. El grano como sustrato permite un crecimiento rápido del hongo y da facilidad para distribuirlo en el sustrato definitivo (paja de trigo). No se deben utilizar los granos que se expanden comercialmente para siembra en el campo, ya que generalmente, están protegidos con fungicidas.

Para preparar el inóculo de grano, se lavó el grano de trigo y se coció en agua a temperatura de ebullición durante 50 minutos. A continuación se drenó el agua caliente y se enfrió el grano al chorro de agua. Se pesó el grano frío, se adicionó sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4$ ) al 1.3% y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) al 0.3%, se mezcló y colocó en bolsas de polietileno (cerrándolas con clips).

Posteriormente se esterilizaron a  $121^\circ\text{C}$  y 1.02 atm. de presión durante dos horas. Una vez frío el grano, se inoculó cada bolsa con el micelio proveniente de una caja petri sembrada una semana antes. Las bolsas inoculadas se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 14 días en condiciones de oscuridad (Alcántara, 1990; Sánchez, 1993b).

### 3.3.4 SUSTRATO DE PAJA.

Para preparar este sustrato se cortó la paja de trigo en pedazos de 1 a 7cm de largo. A continuación se pesó y sumergió en agua durante 24 horas para su total hidratación. Posteriormente se drenó el exceso de agua y se pesó en cajas petri o en bolsas de polietileno, las cuales se cerraron con clips y esterilizaron a  $121^\circ\text{C}$  y 1.02 atm. de presión durante 2 horas. Finalmente se sembraron con el inóculo de grano preparado 14 días antes (Sánchez, 1993b).

### 3.3.5 HIBRIDIZACIÓN DE CEPAS MONOCARIÓTICAS

Se cortó un cuadro de agar de 0.2 X 0.2cm de lado de la periferia de una colonia en crecimiento, de cada uno de los dos monocariotes a hibridizar. Estos cuadros de agar se colocaron en una caja petri con 10ml de medio de agar de extracto de malta (lo más cercano posible). Se realizaron cuatro cruces en una misma caja. A continuación se incubaron las cajas petri a  $28^\circ\text{C}$  por 6 días para ser observadas microscópicamente con el ocular de 16 campos de amplificación. Una cruz se determinó como positiva cuando al ser observada al microscopio se apreciaron las fibulas. Para evitar errores se consideró que la cruz fue positiva cuando estas estructuras fueron observadas por lo menos en tres puntos diferentes situados de manera equidistante en la periferia de la colonia. Las fibulas son estructuras que se forman únicamente cuando se lleva a cabo una fusión celular entre las cepas hibridizadas, su presencia implica que los dos monocariotes apareados son compatibles y por lo tanto dan origen a la formación de un dicariote. (Eger, 1978a; Ramírez, 1989).

Con este procedimiento se determinó el tipo de compatibilidad de las cepas monocariotes en estudio.

### **3.3.6 RECOLECCIÓN DE LA ESPORADA.**

Las esporas de los cuerpos fructíferos se colectaron sobre un papel filtro estéril colocado dentro de una caja petri estéril. Para ello la base del pie del esporoforo se colocó sobre un cubreobjeto para evitar que el papel se humedeciera (y las esporas germinaran). La caja con el hongo se introdujo en una bolsa de polietileno con un poco de agua en el fondo (se le hicieron 4 orificios a la bolsa para facilitar el intercambio de aire del cuerpo fructífero) y se dejó de 12 a 24 horas. Posteriormente se retiró el cuerpo fructífero (bajo condiciones asepticas) se dobló el papel filtro y se guardó dentro de un sobre estéril que se introdujo en una bolsa de polietileno con unos granos de sílica gel. Las esporas se almacenaron en refrigeración a 5°C (Eger, 1978a).

### **3.3.7 GERMINACIÓN DE ESPORAS.**

Para la germinación de esporas se cortó un pedazo de papel filtro de 1 X 1 cm de lado que contenía a las esporas y se depositó en un vial con 5ml de agua destilada estéril, se agitó y la suspensión de esporas resultante se diluyó hasta  $1 \times 10^{-6}$ .

Se prepararon 21 cajas petri con 10 ml de medio de agar extracto de malta (para cada cuerpo fructífero) y se inocularon por triplicado con 20  $\mu$ l de la suspensión original de esporas y de cada dilución. Todas las cajas se incubaron a 28°C durante 2 días. A partir de este momento se examinaron todas las cajas diariamente con la ayuda de un microscopio por 10 días y se transfirieron todas las esporas que germinaron a cajas petri con medio de agar extracto de malta. (Eger, 1978a).

## **3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se realizó análisis de varianza y se determinó su homogeneidad, si la varianza es homogénea se interpreta como tal, si no es homogénea se transforman los resultados hasta llegar a obtener una varianza homogénea.

Si existió diferencia significativa o altamente significativa en el análisis de varianza se aplican pruebas de rango múltiple.

Con la prueba de rango múltiple que dió mayor número de grupos se hizo una clasificación de los resultados para la variable en estudio.

Estas pruebas se aplicaron para evaluar la velocidad de crecimiento micelial de las cepas inoculadas en agar y en paja, así como, para evaluar la eficiencia biológica (Little y Hills, 1978)



## CAPÍTULO IV

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **4.1 RESULTADOS.**

#### **4.1.1 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO.**

Una vez obtenidas las 22 cepas monocariotes (10 fructificantes, 10 silvestres y 2 componentes monocariotes de una cepa asporógena) y una cepa dicariótica que se utilizó como control, se procedió a determinar su velocidad de crecimiento. Para ello, se resembraron por triplicado todas las cepas en agar extracto de malta con un inóculo de 0.4 cm de diámetro al centro de una caja petri. Al mismo tiempo se sembraron cuatro cajas petri con paja con cuatro inóculos por cepa. Se midió el crecimiento cada dos días y se realizó un análisis estadístico para clasificar las cepas de acuerdo a su velocidad de crecimiento. Los resultados de los estudios en agar extracto de malta y paja, respectivamente, se presentan en las Tablas I y II.

En la Tabla I se observa que a los 8 días de incubación los diámetros de las colonias de los diferentes monocariotes evaluados en agar extracto de malta, fluctuó desde 1.34 hasta 7.27 cm en comparación con la cepa control que invadió completamente la caja (con un crecimiento de 8.50 cm de diámetro). A los 16 días de incubación, el crecimiento micelial fluctuó de 2.32 a 7.43 cm de diámetro en comparación con 10 cepas (más el control, anteriormente mencionado) con completa invasión del medio, 8.50 cm de diámetro. A los 24 días de incubación los diámetros de las colonias fluctuaron de 2.88 a 8.18 cm en comparación con 13 cepas (incluyendo la cepa control con 8.50 cm). A los 32 días de incubación, el crecimiento micelial fluctuó de 3.55 a 8.30 cm de diámetro en comparación con 15 cepas que invadieron completamente la caja.

En la Tabla II se observa que a los 4 días de incubación los diámetros de las colonias de los diferentes monocariotes evaluados en paja de trigo, fluctuó desde 0.61 a 2.67 cm. A los 8 días de incubación los diámetros fluctuaron de 1.58 a 3.98 cm en comparación con 8 cepas, incluyendo la cepa control, presentando 4 cm de diámetro (caja completamente invadida). A los 12 días de incubación los diámetros fluctuaron de 2.55 a 3.95 cm, en comparación con 16 cepas cuyo crecimiento micelial presentó 4 cm de diámetro. A los 16 días de incubación los diámetros fluctuaron de 3.05 a 3.95 cm, en comparación con 18 cepas cuyo diámetro alcanzó los 4 cm.

En este caso, 4 cm se toma como diámetro máximo de la colonia y los tiempos de incubación son la mitad de los días de incubación de las cepas inoculadas en agar, por presentar 4 inóculos por caja, a diferencia de las cajas con agar extracto de malta con un inóculo.

**Tabla I.** Evaluación del crecimiento micelial (media y desviación estándar de los diámetros) de las 23 cepas inoculadas en agar, después de 8, 16, 24 y 32 días de incubación. (No hubo fructificación en agar extracto de malta).

TIPOS DE CEPAS	DIÁMETROS ( $\bar{x} \pm \sigma$ )			
	TIEMPO DE INCUBACIÓN (días)			
	8	16	24	32
<b>Fructificantes</b>				
P 400	4.12 ± 0.18	7.12 ± 1.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 405	6.42 ± 0.02	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 406	2.24 ± 0.18	4.01 ± 0.38	5.46 ± 0.27	6.92 ± 0.05
P 407	5.94 ± 0.10	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 408	2.20 ± 0.12	3.56 ± 0.12	5.70 ± 0.26	7.86 ± 0.19
P 409	2.58 ± 0.12	4.60 ± 0.06	5.95 ± 0.13	7.45 ± 0.08
P 410	1.34 ± 0.07	2.32 ± 0.07	2.88 ± 0.07	3.55 ± 0.05
P 415	4.83 ± 0.32	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 416	4.82 ± 0.05	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 417	6.15 ± 0.16	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
<b>Silvestres</b>				
P 403	3.74 ± 0.23	6.42 ± 0.32	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 404	4.70 ± 0.12	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 411	6.39 ± 0.67	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 412	2.84 ± 0.03	5.23 ± 0.40	7.12 ± 0.71	8.30 ± 0.26
• Progenie de la cepa P 11				
P 11.1	2.55 ± 0.10	4.84 ± 0.07	6.82 ± 0.16	7.40 ± 0.12
P 11.2	3.64 ± 0.14	7.43 ± 0.12	8.18 ± 0.07	8.50 ± 0.00
P 11.3	6.99 ± 0.02	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 11.4	4.08 ± 0.14	6.41 ± 0.39	7.67 ± 0.34	8.50 ± 0.00
• Componentes monocariotes de la cepa P 21				
P 21-1	6.91 ± 0.22	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
P 21-2	2.46 ± 0.20	3.87 ± 0.25	4.87 ± 0.25	6.24 ± 0.25
<b>Componentes monocariotes de la cepa P 22</b>				
P 22-1	2.51 ± 0.05	3.62 ± 0.11	4.58 ± 0.32	5.63 ± 0.29
P 22-2	7.27 ± 0.20	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00
<b>Cepa control</b>				
P 14	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00	8.50 ± 0.00

**Tabla II.** Evaluación del crecimiento micelial (media y desviación estándar de los diámetros) de las 23 cepas inoculadas en paja, después de 4, 8, 12 y 16 días de incubación.

TIPOS DE CEPAS	DIÁMETROS ( $\bar{x} \pm \sigma$ )			
	TIEMPO DE INCUBACIÓN (días)			
	4	8	12	16
<b>Fructificantes</b>				
P 400	2.42 ± 0.22	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 405 *	2.42 ± 0.24	3.87 ± 0.25	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 406	1.23 ± 0.17	2.28 ± 0.09	2.95 ± 0.13	4.00 ± 0.00
P 407	2.12 ± 0.13	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 408	1.14 ± 0.32	2.08 ± 0.47	2.87 ± 0.29	3.32 ± 0.33
P 409	1.25 ± 0.31	2.59 ± 0.19	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 410	0.62 ± 0.12	1.78 ± 0.28	2.55 ± 0.24	3.05 ± 0.18
P 415	1.90 ± 0.14	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 416	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
P 417	2.21 ± 0.24	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
<b>Silvestres</b>				
P 403	1.27 ± 0.22	2.29 ± 0.26	3.95 ± 0.06	4.00 ± 0.00
P 404	0.61 ± 0.17	1.58 ± 0.27	2.66 ± 0.16	3.95 ± 0.10
P 411	1.90 ± 0.30	3.95 ± 0.06	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 412	0.49 ± 0.17	1.55 ± 0.25	2.74 ± 0.41	3.92 ± 0.10
• Progenie de la cepa P 11				
P 11.1 *	1.31 ± 0.22	2.94 ± 0.13	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 11.2	1.61 ± 0.13	2.85 ± 0.21	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 11.3 *	2.67 ± 0.33	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 11.4	2.05 ± 0.10	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
• Componentes monocariotes de la cepa P 21				
P 21-1 *	2.28 ± 0.20	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 21-2	1.86 ± 0.08	2.86 ± 0.07	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
<b>Componentes monocariotes de la cepa P 22</b>				
P 22-1	1.05 ± 0.20	2.43 ± 0.16	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
P 22-2	2.44 ± 0.07	3.98 ± 0.05	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
<b>Cepa control</b>				
P 14	2.42 ± 0.03	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00

(\*) Cepas con fructificación positiva.

#### **4.1.1.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO EN AGAR EXTRACTO DE MALTA Y PAJA DE TRIGO.**

Se determinó si se cumplía con la exigencia de homogeneidad de la varianza por medio de la prueba de Bartlett-Box y Hartley.

Se realizó un análisis de varianza para ver si existía diferencia significativa entre las cepas en cuanto al diámetro de las colonias para ambos sustratos.

Cuando existió diferencia significativa en el análisis de varianza se aplicaron las pruebas de rango múltiple de LSD, Tukey, SNK y Duncan para cada uno de los tiempos de incubación, con el objeto de observar las cepas que presentaron mayor crecimiento cada semana y aquella prueba donde se obtuvo el mayor número de grupos fue la que se utilizó para interpretar los resultados Tablas III y IV.

**a) Cepas inoculadas en agar extracto de malta.** Para el primer período (8 días de incubación) se obtuvieron 13 grupos en base a la prueba LSD de acuerdo a su desarrollo miceliar. La cepa P 410 fue la que presentó el menor crecimiento y la cepa P 14 fue la que presentó mayor crecimiento. Para el segundo período (16 días de incubación), se obtuvieron 8 grupos en base a la prueba de Tukey de acuerdo a su desarrollo miceliar, la cepa P 410 fue nuevamente la que presentó el menor crecimiento y las cepas P 405, P 407, P 415, P 416, P 417, P404, P 411, P 22-2, P 11.3, P 21-1 y P 14, fueron las que presentaron mayor crecimiento. Para el tercer período (24 días de incubación) se obtuvieron 8 grupos en base a la prueba de Tukey; nuevamente la cepa P 410 presentó el menor crecimiento miceliar y las cepas P 400, P 405, P 407, P 415, P 416, P 417, P 403, P 404, P 411, P 22-2, P 11.3, P 21-1 y P 14 presentaron mayor crecimiento miceliar. Para el cuarto período (32 días de incubación), se obtuvieron 8 grupos en base a la prueba de LSD.; la cepa P 410 nuevamente presentó el menor crecimiento miceliar y las cepas P 400, P 405, P 407, P 415, P416, P 417, P 403, P 404, P 411, P 22-2, P 11.2, P 11.3, P 11.4, P 21-1 y P 14 fueron las que presentaron mayor crecimiento miceliar (Tabla III).

**Tabla III.** Clasificación de las cepas inoculadas en agar en función del crecimiento micelial.

Cepas	1 <sup>er</sup> Período 8 días (LSD)	Cepas	2 <sup>o</sup> Período 16 días (Tukey)	Cepas	3 <sup>er</sup> Período 24 días (Tukey)	Cepas	4 <sup>o</sup> Período 32 días (LSD)
P 410	a	P 410	a	P 410	a	P 410	a
P 408	b	P 408	b	P 22-1	b	P 22-1	b
P 406	b	P 22-1	b	P 21-2	b	P 21-2	c
P 21-2	b	P 21-2	b	P 406	c	P 406	d
P 22-1	b	P 406	b	P 408	d	P 11.1	e
P 11.1	c	P 409	c	P 409	d	P 409	e
P 409	d	P 11.1	d	P 11.1	e	P 408	f
P 412	e	P 412	e	P 412	e	P 412	g
P 11.2	f	P 11.4	f	P 11.4	f	P 400	h
P 403	f	P 403	f	P 11.2	g	P 405	h
P 11.4	g	P 400	f	P 400	h	P 407	h
P 400	g	P 11.2	g	P 405	h	P 415	h
P 404	h	P 405	h	P 407	h	P 416	h
P 416	h	P 407	h	P 415	h	P 417	h
P 415	h	P 415	h	P 416	h	P 403	h
P 407	i	P 416	h	P 417	h	P 404	h
P 417	i	P 417	h	P 403	h	P 411	h
P 411	j	P 404	h	P 404	h	P 22-2	h
P 405	j	P 411	h	P 411	h	P 11.2	h
P 21-1	k	P 22-2	h	P 22-2	h	P 11.3	h
P 11.3	k	P 11.3	h	P 11.3	h	P 11.4	h
P 22-2	l	P 21-1	h	P 21-1	h	P 21-1	h
P 14	m	P 14	h	P 14	h	P 14	h

**Nota:** Letras diferentes para un mismo tiempo indica que existe diferencia significativa entre los diámetros de las cepas para un nivel de significancia del 0.05.

Al analizar el diámetro de las colonias en agar con respecto a los cuatro tiempos de incubación, se observó que existía diferencia altamente significativa. La prueba de Duncan indicó que todas las cepas presentaban crecimiento durante las 3 primeras semanas y no hubo diferencia significativa en su crecimiento entre la tercera y cuarta semana (Tabla IV).

Tabla IV. Clasificación de las cepas inoculadas en agar en función de los tiempos de incubación.

Tiempo (días)	Crecimiento promedio ( $\bar{x} \pm \sigma$ )	Clasificación (Prueba de Duncan)
8	4.49 $\pm$ 1.98	a
16	6.65 $\pm$ 2.11	b
24	7.38 $\pm$ 1.64	c
32	7.86 $\pm$ 1.22	c

Nota: Letra diferente indica diferencia significativa entre los tiempos involucrados en el crecimiento micelial en las cepas para un nivel de significancia del 0.05.

Con respecto a las repeticiones, el análisis de varianza indicó que no existía diferencia significativa entre las repeticiones, es decir, el número de repeticiones para esta evaluación (agar extraído de malta) fue suficiente.

**b) Cepas inoculadas en paja de trigo.** Para el primer período (4 días de incubación), se obtuvieron 11 grupos con base en la prueba de Tukey, de acuerdo a su desarrollo micelial: la cepa P 416 fue la que presentó el menor crecimiento y las cepas P 417, P 21-1, P 400, P 14, P 405, P 22-2 y P 11.3 fueron las que presentaron mayor crecimiento. Para el segundo período (8 días de incubación), se obtuvieron 7 grupos en base a la prueba de Tukey, la cepa P 416 no presentó crecimiento, la cepa P 412 fue la que presentó el menor crecimiento micelial y las cepas P 405, P 411, P 22-2, P 400, P 407, P 415, P 417, P 11.3, P 11.4, P 21-1 y P 14 fueron las que presentaron mayor crecimiento. Para el tercer período (12 días de incubación), se obtuvieron 6 grupos en base a la prueba LSD, la cepa P 416 continuó sin presentar crecimiento, la cepa P 410 presentó el menor crecimiento micelial y las cepas P 403, P 400, P 405, P 407, P 415, P 417, P 411, P 22-1, P 22-2, P 11.1, P 11.2, P 11.3, P 11.4, P 21-1, P 21-2 y P 14 fueron las que presentaron mayor crecimiento. Para el cuarto período (16 días de incubación), se obtuvieron 4 grupos en base a la prueba de Duncan (que es la más exigente), la cepa P 416 no presentó crecimiento, la cepa con menor crecimiento fue P 410, seguida por la cepa P 408 y el resto de las cepas presentaron el mayor crecimiento micelial (4 cm de diámetro) Tabla V.

**Tabla V.** Clasificación de las cepas inoculadas en paja de trigo, en función de su crecimiento micelial.

Cepas	1 <sup>er</sup> Período 4 días (Tukey)	Cepas	2 <sup>o</sup> Período 8 días (Tukey)	Cepas	3 <sup>er</sup> Período 12 días (LSD)	Cepas	4 <sup>o</sup> Período 16 días (Duncan)
P 416	a	P 416	a	P 416	a	P 416	a
P 412	b	P 412	b	P 410	b	P 410	b
P 404	c	P 404	b	P 404	b	P 408	c
P 410	c	P 410	b	P 412	c	P 412	d
P 22-1	d	P 408	c	P 408	d	P 404	d
P 408	d	P 406	c	P 406	e	P 400	d
P 406	e	P 403	c	P 403	f	P 405	d
P 409	e	P 22-1	d	P 400	f	P 406	d
P 403	e	P 409	e	P 405	f	P 407	d
P 11.1	c	P 11.2	f	P 407	f	P 409	d
P 11.2	f	P 21-2	f	P 409	f	P 415	d
P 21-2	g	P 11.1	f	P 415	f	P 417	d
P 411	h	P 405	g	P 417	f	P 403	d
P 415	i	P 411	g	P 411	f	P 411	d
P 11.4	j	P 22-2	g	P 22-1	f	P 22-1	d
P 407	j	P 400	g	P 22-2	f	P 22-2	d
P 417	k	P 407	g	P 11.1	f	P 11.1	d
P 21-1	k	P 415	g	P 11.2	f	P 11.2	d
P 400	k	P 417	g	P 11.3	f	P 11.3	d
P 14	k	P 11.3	g	P 11.4	f	P 11.4	d
P 405	k	P 11.4	g	P 21-1	f	P 21-1	d
P 22-2	k	P 21-1	g	P 21-2	f	P 21-2	d
P 11.3	k	P 14	g	P 14	f	P 14	d

**Nota:** Letras diferentes para un mismo tiempo indica que existe diferencia significativa entre los diámetros de las cepas para un nivel de significancia del 0.05.



Al analizar el diámetro de las colonias en paja con respecto a los cuatro tiempos de incubación se observó que existía diferencia altamente significativa. La prueba de Duncan indicó que todas las cepas presentaban crecimiento durante las tres primeras mediciones y no hubo diferencia significativa en su crecimiento entre la tercera y cuarta medición. Tabla VI:

**Tabla VI.** Clasificación de las cepas inoculadas en paja de trigo en función a los tiempos de incubación.

Tiempo (días)	Crecimiento promedio ( $\bar{x} \pm \sigma$ )	Clasificación (Prueba de Duncan)
4	1.62 $\pm$ 0.75	a
8	3.01 $\pm$ 1.11	b
12	3.56 $\pm$ 0.93	c
16	3.76 $\pm$ 0.84	c

**Nota:** Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tiempos involucrados en el crecimiento micelial de las cepas para un nivel de significancia del 0.05.

Con respecto a las repeticiones el análisis de varianza indicó que no existía diferencia significativa entre las repeticiones, es decir, el número de repeticiones para esta evaluación fue suficiente.

Del análisis estadístico se concluye que el diámetro de las colonias es diferente para las cepas a evaluar en todos los tiempos; tanto para las cepas inoculadas en las cajas petri con paja, como las cepas inoculadas en agar.

#### 4.1.1.2 FRUCTIFICACIÓN.

Una vez evaluada la velocidad de crecimiento de las cepas inoculadas en agar extracto de malta y en paja, se expusieron a luz (en cuanto el crecimiento micelial invadió toda la caja), cuando aparecían los primordios las cajas eran abiertas para facilitar el desarrollo de cuerpo fructífero que posteriormente era cosechado (con una navaja era cortado el estípite, justo en la base del tallo, en la unión con el sustrato) era pesado y recolectadas sus esporas. A continuación se presenta el tiempo que tarda cada cepa en las diferentes etapas involucradas para la obtención de cuerpos fructíferos (Tabla VII).

Tabla VII: Tiempos necesarios para la obtención de cuerpos fructíferos en cajas petri.

Cepas	Repetición	Incubación	TIEMPO ( días )			
			Exposición a la luz			
			Cajas		Aparición de primordios	Maduración del hongo y corte
Cerradas	Abiertas					
Fructificantes P 405	1	8	59	3	+	3
	2	8	59	13	+	4
	3	8	59	100	-	
	4	8	59	100	-	
Silvestres • Progenie de P 11 P 11.1	1	10	75	93	+	5
	2	10	75	100	-	
	3	10	75	100	-	
	4	10	75	100	-	
P 11.3	1	8	42	5	+	7
	2	8	60	100	-	
	3	8	42	4	+	6
	4	8	60	100	-	
• Componente monocariote P 21 P 21-1 *	1	8	85	0	+	4
	2	8	85	100	-	
	3	8	85	100	-	
	4	8	85	100	-	

\* Caja contaminada pero con producción del cuerpo fructífero.

Como se observa en la Tabla VII únicamente las cepas P 405, P 11.1, P 11.3 y P 21-1 presentaron primordios, los cuales se desarrollaron como cuerpos fructíferos.

Para la cepa fructificante P 405, en la repetición 1, se incubó por 8 días bajo condiciones de oscuridad a 28°C, después se expuso a la luz por 59 días, después de 3 días de haber sido abierta presentó la aparición de primordios, en 3 días más el cuerpo fructífero maduró y fue cosechado. La repetición 2 también se incubó por 8 días, se expuso a la luz 59 días y después de 13 días de permanecer abierta la caja, aparecieron los primordios, que tres días después dieron origen a cuerpos fructíferos maduros. Para las repeticiones 3 y 4, después de haber invadido la caja por completo y dejarse abierta durante 100 días, no se observó la aparición de primordios.

La cepa silvestre P11.1 (progenie de la cepa P 11) repetición 1, se incubó por 10 días, se expuso a la luz por 75 días y después de 93 días de estar abierta presentó primordios, en 5 días más el cuerpo fructífero maduró y fue cosechado. Las repeticiones 2, 3 y 4 se dejaron abiertas por 100 días sin observar la aparición de primordios.

La cepa silvestre P 11.3 (progenie de la cepa P 11) repetición 1, se incubó por 8 días, se expuso a la luz por 42 días y después de 5 días de haber sido abierta presentó la aparición de primordios, en 7 días más maduró y se cosecho el cuerpo fructífero. La repetición 3 también se incubó por 8 días, se expuso a la luz 42 días y después de 4 días de abrir la caja aparecieron los primordios que 6 días después dieron origen a cuerpos fructíferos maduros. Para las repeticiones 2 y 4 después de haber invadido la caja por completo y dejarse abiertas por 100 días, no se observó la aparición de primordios.

La cepa P 21-1 (componente monocariote de la cepa P 21) repetición 1, se incubó por 8 días se expuso 85 días a la luz, aparecieron los primordios y la caja tuvo que ser abierta para que se desarrollaran, lo cual tardó 4 días y los cuerpos fructíferos fueron cosechados. Las repeticiones 2, 3 y 4 después de dejarse abiertas por 100 días no presentaron primordios.

A continuación se presentan las cepas que produjeron cuerpos fructíferos, indicándose el número de cuerpos fructíferos y sus pesos respectivos (Tabla VIII).

Cabe mencionar que ninguna de las cepas fructificó en medio agar extracto de malta; sin embargo, solo se observó la aparición de primordios muy pequeños en las mismas cepas que fructificaron en paja.

**Nota:** La cepa control no presentó fructificación.

Tabla VIII. Fructificación en paja en cajas petri.

Cepas	Fructificación	Repetición	Número		Peso del hongo (g)
			primordios	hongos	
Fructificantes P 405	+	1	1	1	1.25
		1	1 *	1	0.25
Silvestres					
• Progenie de P 11					
P 11.1	+	1	3	1	0.20
P 11.3	+	1	2	1	0.20
		2	1	1	0.50
• Componentes monocariotes de la P 21					
P 21-1	+	1	1	1 *	0.57
Control P 14	-				

\*<sub>1</sub> Fructificación en la misma caja 10 días después

\*<sub>2</sub> Caja contaminada (aún así, hubo desarrollo del cuerpo fructífero).

Como se observa en la Tabla VIII solo la cepa P 405 presentó 2 cuerpos fructíferos en la misma caja (con un intervalo de 10 días), dicha cepa dio uno de los cuerpos fructíferos más grandes.

La cepa P 11.1 presentó uno de los cuerpos fructíferos más pequeños. La cepa P 11.3 fue la única que produjo cuerpos fructíferos en dos cajas; para todas las demás cepas solo fructificó una caja.

Una vez cortado el cuerpo fructífero de cada cepa, se recolectaron las esporas en papel filtro y se almacenaron con granos de sílica gel bajo condiciones de refrigeración (5°C).

Las cajas petri con sustrato agar y paja al estar expuestas a la luz durante varios días (con poca humedad ambiental) se comenzaron a deshidratar y al estar abiertas en un lugar poco aislado, se contaminaban fácilmente con mohos. Después de aproximadamente 40 días (bajo dichas condiciones) las cajas fueron introducidas a un "invernadero" y al paso de 25 días con medio ambiente húmedo, comenzaron a fructificar las cepas.

Al observar lo anterior, se decidió repetir el experimento utilizando frascos de vidrio para impedir la pérdida rápida de humedad del sustrato y facilitar la penetración de la luz (ya que en las cajas petri las cepas perdieron humedad rápidamente).

La cepa testigo no fructificó por las condiciones ambientales poco favorables para su desarrollo.

El nivel de fructificación durante esta etapa del experimento fue muy bajo, de las 23 cepas en estudio solo fructificaron 4 cepas, todas ellas monocaríotes.

#### **4.1.2 SIEMBRA EN PAJA CON INÓCULO DE GRANO AL 5% EN FRASCOS DE VIDRIO.**

Dados los problemas de deshidratación del sustrato que se presentaron en el experimento anterior, se pensó en repetirlo utilizando frascos de vidrio en donde el área de exposición al medio ambiente es menor, para ello se utilizaron frascos de vidrio que contenían 20 g de paja húmeda y en esta ocasión se sembraron con inóculo de grano para aumentar los puntos de inoculación y facilitar el proceso de invasión del sustrato con el micelio. Se sembraron 4 frascos por cada cepa, se incubaron de 12 a 20 días a 28°C en condiciones de obscuridad, cuando el sustrato era invadido en su totalidad por el micelio, los frascos eran expuestos a la luz tapados con bolsas de polietileno con diversas perforaciones que facilitan la respiración de la cepa.

Cepa fructificante P 405: el frasco # 1 tardó 12 días en invadir el sustrato, se expuso a la luz 21 días (el frasco cerrado) y después de 24 días de estar abierto aparecieron los primordios, los cuales tardaron 3 días en madurar. Los frascos 2, 3 y 4 estuvieron abiertos y expuestos a la luz 100 días sin presentar primordios.

Cepa fructificante P 409: el frasco # 1 tardó 12 días en invadir el sustrato, se expuso a la luz 82 días (frasco cerrado) y después de 24 días de estar abierto aparecieron los primordios, los cuales tardaron 6 días en madurar. Los frascos 2, 3 y 4 estuvieron abiertos y expuestos a la luz 100 días sin presentar primordios.

Cepa silvestre P11.1 (progenie de P 11): el frasco # 1 tardó 12 días en invadir el sustrato, se expuso a la luz 25 días, después de los cuales permaneció abierto 29 días para la aparición de los primordios, los cuales tardaron 8 días en madurar. Los frascos 2, 3 y 4 estuvieron abiertos y expuestos a la luz 100 días sin presentar primordios.

Cepa silvestre P 11.2 (progenie de P 11): el frasco # 1 tardó 12 días en invadir el sustrato, se expuso a la luz 27 días y al aparecer los primordios el frasco fue abierto, los cuerpos fructíferos fueron cosechados 6 días después. Los frascos 2, 3 y 4 estuvieron abiertos y expuestos a la luz 100 días sin presentar primordios.

Cepa silvestre P 11.3 (progenie de P 11): el frasco # 1 tardó 12 días en invadir el sustrato, se expuso a la luz 21 días y después de 26 días de estar abierto aparecieron los primordios, los cuales tardaron 8 días en madurar. Los frascos 2, 3 y 4 estuvieron abiertos y expuestos a la luz 100 días sin presentar primordios.

Cepa P 21-1 (Componente monocariote de P 21): el frasco # 1 después de invadir el sustrato se expuso a la luz 106 días y al aparecer los primordios el frasco fue abierto, después de 5 días se cosecharon los cuerpos fructíferos. Los frascos 2, 3 y 4 estuvieron abiertos y expuestos a la luz 80 días sin presentar primordios.

Cepa control P 14, el frasco # 1 tardó 12 días en invadir el sustrato, se expuso a la luz 58 días apareciendo los primordios el frasco fue abierto, en 4 días los primordios maduraron y fueron cosechados como cuerpos fructíferos. El frasco # 2 se expuso a la luz 47 días y al aparecer los primordios el frasco fue abierto, después de 6 días los cuerpos fructíferos maduros fueron cosechados. Las repeticiones 3 y 4 estuvieron abiertas y expuestas a la luz 100 días sin presentar primordios. Lo anterior se resume en la Tabla IX.

Tabla IX. Obtención de cuerpos fructíferos en frascos de vidrio, inoculados con granos de trigo al 5 %.

Cepas	Frasco #	Incubación	T I E M P O ( días )			
			Exposición a la luz			
			Frascos		Formación de primordios	Maduración del hongo y corte
Cerrados	Abiertos					
Fructificantes P 405	1	12	21	24	+	3
	2	12	21	100	-	
	3	12	21	100	-	
	4	12	21	100	-	
P 409	1	12	82	24	+	6
	2	12	82	100	-	
	3	12	82	100	-	
	4	12	82	100	-	
Silvestres • Progenie de P 11 P 11.1	1	12	25	29	+	8
	2	12	25	100	-	
	3	12	25	100	-	
	4	12	25	100	-	
P 11.2	1	12	27	0	+	6
	2	12	27	100	-	
	3	12	27	100	-	
	4	12	27	100	-	
P 11.3	1	12	21	26	+	8
	2	12	21	100	-	
	3	12	21	100	-	
	4	12	21	100	-	
• Componente monocariote de la P 21 P 21-1	1	12	106	0	+	5
	2	12	106	80	-	
	3	12	106	80	-	
	4	12	106	80	-	
Control P 14	1	12	58	0	+	4
	2	12	47	0	+	6
	3	12	58	100	-	
	4	12	58	100	-	

En la siguiente tabla se indican las cepas que fructificaron, el número de cuerpos fructíferos y sus pesos respectivos (Tabla X).

**TABLA X.** Peso de los cuerpos fructíferos obtenidos en frascos de vidrio con paja.

Cepas	Repetición	Número		Peso del hongo (g)
		primordios	hongos	
Fructificantes				
P 405	1	1	1	0.52
P 409	1	6	1	0.60
Silvestres				
• Progenie de P 11				
P 11.1	1	3	3	0.51
				0.40
				0.93
P 11.2	1	1	1	2.47
P 11.3	1	3	3	1.97
				0.52
				0.50
• Componente monocariote de P 21				
P 21-1	1	1	1	1.30
Control				
P 14	1	1	1	4.57
	2	1	1	2.28

Como se observa en la Tabla X la cepa fructificante P 405 solo presentó fructificación el frasco # 1 con un primordio, el cual se desarrolló y tuvo un peso de 0.52 g al momento de ser cosechado.

Cepa fructificante P 409. El frasco # 1 presentó 6 primordios, de los cuales solo uno se desarrolló como cuerpo fructífero de 0.60 g.

Cepa silvestre P 11.1 (progenie de P 11). El frasco # 1 presentó 3 primordios que se desarrollaron como cuerpos fructíferos con pesos de 0.51, 0.40 y 0.93 g.



La cepa silvestre P 11.2 (progenie de P 11) presentó un primordio, el cual se desarrolló con un peso final de 2.47 g al momento de ser cosechado.

La cepa silvestre P 11.3 (progenie de P 11) presentó 3 primordios que se desarrollaron como cuerpos fructíferos con pesos de 1.97, 0.52 y 0.50 g, respectivamente.

La cepa P 21-1 (componente monocariótico de P 21) presentó un solo primordio que al madurar pesó 1.30 g.

La cepa control P 14 presentó el cuerpo fructífero más grande de 4.57 g.

Todas las cepas fructificaron en un solo frasco, a excepción del control que fructificó en dos frascos.

La mayoría de las cepas presentaron un solo cuerpo fructífero por cada frasco, a excepción de las cepas P 11.1 y P 11.3 que presentaron 3 cuerpos fructíferos en cada frasco.

El nivel de fructificación en esta segunda etapa del experimento fue mayor que en la primer fructificación; de las 23 cepas, fructificaron 7 cepas, 6 de las cuales son monocariotes y la cepa dicariote utilizada como control.

#### **4.1.2.1 RECOLECCIÓN DE ESPORAS.**

Para las cepas que fructificaron, los hongos fueron cosechados, pesados y colocados en papel filtro estéril dentro de una bolsa de polietileno con perforaciones (cámara húmeda) durante 24 horas. Posteriormente el cuerpo fructífero fue retirado y el papel filtro doblado y guardado en una bolsa de polietileno con unos granos de sílica gel (la bolsa fue sellada y guardada a 5°C hasta su utilización). Todo bajo condiciones asepticas.

#### **4.1.2.2 GERMINACIÓN.**

Se realizaron diluciones en vial con la esporada (papel filtro) de los cuerpos fructíferos de la fructificación en la primera y segunda etapa. Las diluciones se sembraron en agar (10 ml) para propiciar la germinación.

La germinación fue negativa para todas las cepas.

Los cuerpos fructíferos fueron cosechados de 4 a 8 días después de aparecer los primordios, por lo tanto se tienen tres posibilidades:

- 1) Son cuerpos fructíferos asporógenos.
- 2) Producen muy pocas esporas.
- 3) Los cuerpos fructíferos fueron cosechados demasiado tarde y probablemente todas las esporas ya habían sido soltadas y por lo tanto no hubo recolección en el papel.

### 4.1.3 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS FRUCTIFICACIONES DE LA PRIMERA Y SEGUNDA FASE DEL EXPERIMENTO.

Las cepas que fructificaron en ambas etapas fueron:

- P 405
- P 11.1
- P 11.3
- P 21-1

Las cepas que fructificaron en ambas etapas se enlistan en forma creciente considerando el tiempo que tardaron en fructificar.

P 11.3  
P 405  
P 21-1 y P 11.1

Lo anterior se observa en la Tabla XI y en la Gráfica I.

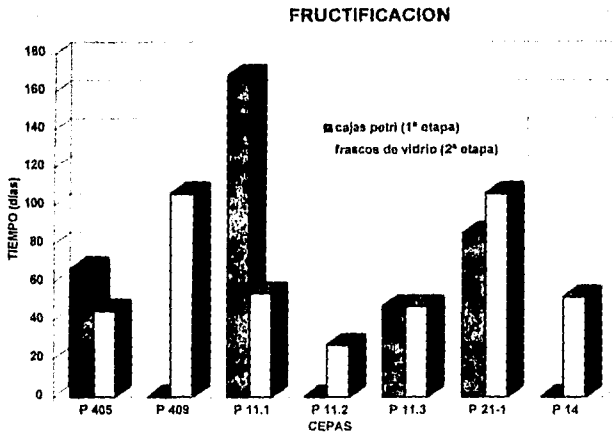
**Tabla XI.** Resumen del tiempo necesario para obtener cuerpos fructíferos tanto en cajas petri como en frascos de vidrio.

Cepas	TIEMPO ( días ) *	
	Contenedor	
	Cajas petri	Frascos de vidrio
Fructificantes		
P 405	67	45
P 409	-	106
Silvestres		
P 11.1	168	54
P 11.2	-	27
P 11.3	47	47
P 21-1	85	106
Control		
P. 14	-	52

\* Tiempo en días que las cepas estuvieron expuestas a la luz hasta la aparición de primordios.

( - ) no hubo fructificación

**Gráfica 1.** Comparación del tiempo en días que tardó cada cepa en producir cuerpos fructíferos en cajas petri y en frascos de vidrio.



De las 7 cepas solo 4 fructificaron en ambas fases del experimento.

Con base en lo anterior, se observa que la cepa P 11.3 es una de las mejores cepas, ya que fructificó en ambas fases del experimento en un período relativamente "corto" de 47 días.

#### **4.1.4 SIEMBRA EN PAJA (BOLSAS DE POLIPAPEL) CON INÓCULO DE GRANO AL 7.5 %.**

Por haber obtenido fructificación negativa en el experimento anterior y por el inconveniente de trabajar en frascos de vidrio, se realizó nuevamente el experimento, utilizando en esta ocasión bolsas de polipapel (resistentes a la esterilización).

Las cepas fueron sembradas en paja con inóculo de grano al 7.5 % (para acelerar el desarrollo micelial al haber más puntos de inoculación en la paja).

Se elaboraron 6 bolsas de polipapel con 300 g de paja húmeda para cada cepa. Se le hicieron diversas perforaciones a las bolsas después de la inoculación (con un asa estéril) para facilitar el intercambio de aire.

Después de ser invadida toda la paja con el micelio (incubación de 14 días a 28°C en la obscuridad) las bolsas fueron expuestas a luz y a una humedad relativa del medio ambiente del 90%.

En este experimento no hubo fructificación, las cepas se deshidrataban o contaminaban fácilmente (aún desde su incubación) por estar perforadas las bolsas de polipapel, pero si esta operación no se realiza, no hay crecimiento micelial por la falta de oxígeno. Cuando se trabaja a escala industrial se realizan dichas perforaciones para favorecer el crecimiento micelial.

##### **4.1.4.1 CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS.**

De las 22 cepas estudiadas se observó que 21 crecieron sobre paja de trigo y de estas solo 6 fructificaron. Solo 2 de las 10 cepas clasificadas previamente como fructificantes, presentaron fructificación positiva durante el trabajo realizado en el laboratorio, tales cepas son P 405 y P 409; 4 de las 12 cepas previamente clasificadas con fructificación negativa, fructificaron, dichas cepas son: P 11.1, P 11.2, P 11.3 y P 21-1 (Tabla XII).

**Tabla XII.** Comparación de la clasificación de las cepas, previa al estudio y con base en los resultados del experimento.

CLASIFICACIÓN PREVIA	CLASIFICACIÓN CON BASE EN LOS RESULTADOS
Cepas con fructificación positiva	Cepas con fructificación positiva
P 400	P 405
P 405	P 409
P 406	P 11.1
P 407	P 11.2
P 408	P 11.3
P 409	P 21-1
P 410	P 14 (Cepa control)
P 415	
P 416	
P 417	
P 14 (Cepa control)	
Cepas con fructificación negativa	Cepas con fructificación negativa
P 403	P 400
P 404	P 403
P 411	P 404
P 412	P 406
P 11.1	P 407
P 11.2	P 408
P 11.3	P 410
P 11.4	P 411
P 21-1	P 412
P 21-2	P 415
P 22-1	P 416
P 22-2	P 417
	P 11.4
	P 21-2
	P 22-1
	P 22-2

Nota: La clasificación de las cepas, previa al estudio, se basa en la información proporcionada por los donadores.

#### 4.1.5 DETERMINACIÓN DE TIPOS DE COMPATIBILIDAD E HIBRIDIZACIÓN.

Las seis cepas monocariotes que fructificaron fueron hibridadas entre sí, para determinar su tipo de compatibilidad Tabla XIII.

Tabla XIII: Apareamiento de las cepas monocariotes con fructificación positiva.

Cepas	P 405	P 21-1	P 11.3	P 11.1	P 11.2	P 409
P 405	-	-	-	-	-	+
P 21-1	-	-	-	-	-	+
P 11.3	-	-	-	+	+	-
P 11.1	-	-	+	-	-	-
P 11.2	-	-	+	-	-	-
P 409	+	+	-	-	-	-

La cepa P 409 presentó hibridación positiva o dicariotización con las cepas P 405 y P 21-1. La cepa P 11.3 presentó dicariotización positiva con las cepas P 11.1 y P 11.2. De esta forma se obtuvieron 4 cepas dicariotes Tabla XIV.

Tabla XIV: Cepas dicariotes obtenidas por hibridación.

MONOCARIOTES	DICARIOTES
Fructificantes	
P 405 P 409	P 405 X P 409
Silvestres	
• Componente monocariotico de la cepa P 21 P 21-1	P 409 X P 21-1
• Progenie de la cepa P 11 P 11.1 P 11.2 P 11.3	P 11.1 X P 11.3 P 11.2 X P 11.3

Si clasificamos los monocariotes en tipos de compatibilidad, se observa que las cepas P 405 y P 21-1 pertenecen al grupo I, la P 11.3 al grupo II, las cepas P 11.1 y P 11.2 al grupo III y la P 409 al grupo IV.

De acuerdo a esta clasificación, se sabe que solo es posible obtener dicariotes si se cruzan las cepas de los grupos I y IV, así como entre los grupos II y III. Tabla XV (Eger, 1978a).

**Tabla XV.** Clasificación de las cepas monocariotes con fructificación positiva, de acuerdo a su tipo de compatibilidad.

TIPOS DE COMPATIBILIDAD			
I	II	III	IV
P 405 P 21-1	P 11.3	P 11.1 P 11.2	P 409



#### **4.1.6 SIEMBRA EN PAJA (BOLSAS DE POLIPAPEL) CON INÓCULO DE GRANO AL 10 %.**

Las seis cepas monocariotes que fructificaron y las cuatro dicariotes obtenidos por compatibilidad de las cepas monocariotes, fueron sembradas en bolsas que contenían 1 Kg de paja húmeda (7 bolsas por cepa) con inóculo de grano al 10 %. Después de 24 horas de incubación a 28°C se realizaron perforaciones a las bolsas de polipapel (con esta medida se disminuyó considerablemente la contaminación de las cepas). Se continuó la incubación 14 días más en oscuridad, cuando la paja estaba completamente invadida por micelio, las bolsas fueron expuestas a luz y humedad, para regular esta última se utilizó un humidificador. Con este procedimiento las cepas comenzaron a fructificar a los 10 días de ser expuestas a dichas condiciones. Los cuerpos fructíferos de las cepas dicarióticas a estudiar, fueron pesados para posteriormente calcular la eficiencia biológica.

Se obtuvieron cuerpos fructíferos de las cepas dicarióticas pero no se recolectaron las esporas.

Por las condiciones de incubación (cercanía de las bolsas perforadas de las diferentes cepas), se presentó un entrecruzamiento de las cepas monocariotes obteniendo cepas dicariotes. Se recolectaron los cuerpos fructíferos y las esporadas de estas nuevas dicariotes al pensar que eran monocariotes, pero fueron desechadas posteriormente, al comprobar que no eran las cepas originales (monocariotes).

Se comprobó que eran cepas dicariotes por su abundante esporada, lo cual no se había observado en los experimentos anteriores, algunas esporas se sembraron en cajas petri con 10 ml de agar extracto de malta incubándose de 2 a 3 días, el micelio obtenido por la germinación de las esporas (después de realizar las diluciones) fue observado al microscopio comprobando la presencia de hifas, solamente presentes en cepas dicariotes (donde se ha presentado un apareamiento). También se tomó un poco de paja de la bolsa de cada cepa y se sembró en agar, el micelio fue observado al microscopio 3 días después confirmando el resultado anterior.

La ventaja de trabajar en bolsas de polipapel es la facilidad de cortarla (con navaja o tijeras estériles) en cualquier parte de su superficie permitiendo así el desarrollo normal del primordio y el corte posterior del cuerpo fructífero sin daño o pérdida de peso o esporas y sin dañar la cepa al ser extraído el cuerpo fructífero (permitiendo así la producción de nuevos cuerpos fructíferos).

Cuando se trabaja con cepas monocariotes compatibles, estas deben ser separadas en grupos que no sean compatibles entre sí, para evitar la hibridación o entrecruzamiento accidental durante los periodos de incubación y fructificación.

#### 4.1.6.1 FRUCTIFICACIÓN DE CEPAS DICARIOTES.

A continuación se indica el peso y número de hongos obtenidos en cada bolsa, el número de cosechas y el peso total de la producción para cada cepa Tabla XVI.

Tabla XVI. Fructificación de cepas dicariotes.

Cepas	Bolsas que fructificaron	Cosechas	# de hongos	Peso total de todos los hongos (g)	Peso total de hongos por bolsa	Peso promedio de un hongo por bolsa (g)
P 405 X P 409	1ª	1	4	13.15	13.15	3.28
	2ª	1	2	14.89	14.89	7.44
P 409 X P 21-1	1ª	1	1	57.92	89.02	44.51
	2ª	2	1	31.10		
P 11.1 X P 11.3	1ª	1	5	48.90	48.90	9.78
	2ª	1	30	27.76	27.76	0.92
P 11.2 X P 11.3	1ª	1	37	34.28	34.28	0.92
	2ª	1	32	171.65	205.90	5.41
P 14	1ª	2	1	3.15		
		3	5	31.10		
		1	33	111.85	135.25	3.86
	2ª	2	2	23.40		
		1	18	181.08	194.32	9.71
	3ª	2	2	13.24		
		1	14	72.73	83.18	5.19
	4ª	2	2	10.45		
		1	9	108.45	136.13	12.37
	5ª	2	2	27.68		
		1	3	45.12	150.22	25.03
	6ª	2	3	105.10		
		1	3	57.67	88.77	22.19
	7ª	2	1	31.10		
		1ª	1	1	69.57	69.57
	2ª	1	15	83.00	83.00	5.53
3ª		1	14	79.10	79.10	5.65

Como se observa en la Tabla XV, de las 7 bolsas inoculadas con la cepa P 405 X P 409 solo dos presentaron fructificación. La bolsa # 1 con una cosecha de 4 cuerpos fructíferos de 13.15 g en total y un peso promedio por cuerpo fructífero de 3.28 g. En la bolsa # 2 hubo una cosecha de 2 cuerpos fructíferos con un peso total de 14.89 g y 7.44 g de peso promedio por cuerpo fructífero.

En la cepa P 409 X P 21-1 de las 7 bolsas inoculadas solo 2 presentaron fructificación. La bolsa # 1 en la 1ª cosecha presentó un cuerpo fructífero con un peso de 57.92 g en la segunda cosecha se observó un cuerpo fructífero con 31.10 g; el peso total de los cuerpos fructíferos fue 89.02 g, con un peso promedio por cuerpo fructífero de 44.51 g. En la bolsa # 2 hubo una cosecha de 5 cuerpos fructíferos con un peso total de 48.90 g y de 9.78 g de peso promedio por cuerpo fructífero.

En la cepa P 11.1 X P 11.3 , de las 7 bolsas inoculadas solo 2 fructificaron. La bolsa # 1 con una cosecha de 30 cuerpos fructíferos de 27.76 g en total y un peso promedio por cuerpo fructífero de 0.92 g. En la bolsa # 2 hubo una cosecha de 37 cuerpos fructíferos con un peso total de 34.28 g y de 0.92 g de peso promedio por cuerpo fructífero.

La cepa P 11.2 X P 11.3 presentó fructificación en las 7 bolsas inoculadas.

En la bolsa 1 se presentaron 3 cosechas, con 32, 1 y 5 cuerpos fructíferos respectivamente, su peso total fue de 205.90 g y 5.41 g de peso promedio por cuerpo fructífero.

En la bolsa # 2 se presentaron 2 cosechas, en la primera fueron recolectados 33 cuerpos fructíferos y en la segunda 2, su peso total fue de 135.25 g y 3.86 g es el peso promedio por cuerpo fructífero.

En la bolsa # 3 se presentaron 2 cosechas, en la primera se recolectaron 18 cuerpos fructíferos y en la segunda 2, su peso total de producción fue 194.32 g y 9.71 g como peso promedio por cuerpo fructífero.

En la bolsa # 4 se presentaron 2 cosechas, en la primera con 9 cuerpos fructíferos y en la segunda 2, con un peso total de 83.18 g y 5.19 g de peso promedio por cuerpo fructífero.

En la bolsa # 5 se presentaron 2 cosechas, al igual que la bolsa anterior con 9 y 2 cuerpos fructíferos respectivamente, su peso total de producción fue de 136.13 g y 12.37 g como peso promedio por cuerpo fructífero.

En la bolsa # 6 se presentaron 2 cosechas cada una con 3 cuerpos fructíferos, su peso total de 150.22 g y como peso promedio por cuerpo fructífero de 25.03 g.

En la bolsa # 7 se presentaron 2 cosechas con 3 y un cuerpo fructífero respectivamente su peso total fue de 88.77 g y 22.19 g de peso promedio por cuerpo fructífero.

La cepa control P 14 presentó fructificación en las 3 bolsas inoculadas (con una sola cosecha). De la bolsa 1 se cosechó un cuerpo fructífero de 69.57 g. De la bolsa # 2 se cosecharon 15 cuerpos fructíferos con un peso total de 83.00 g y 5.53 g de peso promedio por cuerpo fructífero. De la bolsa

# 3 se cosecharon 14 cuerpos fructíferos con un peso total de 79.10 g y 5.65 g de peso promedio por cuerpo fructífero.

La Tabla XVII resume los resultados obtenidos en esta fase del experimento, indicando las mejores cepas:

Solo la cepa P 11.2 X P 11.3 tubo fructificación en las 7 bolsas inoculadas (al igual que la cepa control donde fructificaron las 3 bolsas inoculadas), obteniendo en promedio 18 cuerpos fructíferos de 11.96 g cada uno. A diferencia de la cepa P 409 X P 21-1 con solo 3 cuerpos fructíferos de 27.14 g cada uno (peso promedio).

La cepa control sigue siendo la mejor con un promedio de 10 cuerpos fructíferos de 26.91 g cada uno.

Las cepas restantes fueron catalogadas como dicariotes de bajos rendimientos. Así la cepa P 405 X P 409 produjo 3 cuerpos fructíferos de 5.36 g cada uno y la cepa P 11.2 X P 11.3 dio 33 cuerpos fructíferos de 0.92 g cada uno.

**Tabla XVII.** Número y peso promedio de los cuerpos fructíferos en cada cepa.

Cepas	Bolsas		# promedio de hongos por cepa	Peso promedio de un hongo por cepa (g)
	Sembradas	Que fructificaron		
P 405 X P 409	7	2	3.00	5.36
P 409 X P 21-1	7	2	3.50	27.14
P 11.1 X P 11.3	7	2	33.50	0.92
P 11.2 X P 11.3	7	7	18.57	11.96
P 14	3	3	10.00	26.91

#### 4.1.7 EFICIENCIA BIOLÓGICA.

La eficiencia biológica fue calculada mediante la siguiente fórmula (Gómez, 1987):

$$\text{Eficiencia Biológica} = \frac{\text{Peso total de hongos frescos}}{\text{Peso del sustrato seco}} \times 100$$

Nota: En caso de utilizar inóculo de grano, el peso del sustrato seco debe incluir la cantidad de inóculo de grano utilizado en base seca.

A continuación se presenta la eficiencia biológica obtenida en la primer fructificación, en cajas petri y la segunda realizada en frascos de vidrio. Tabla XVIII y Gráfica II.

Tabla XVIII. Eficiencia biológica de las cepas monocariotes en la primera y segunda fructificación.

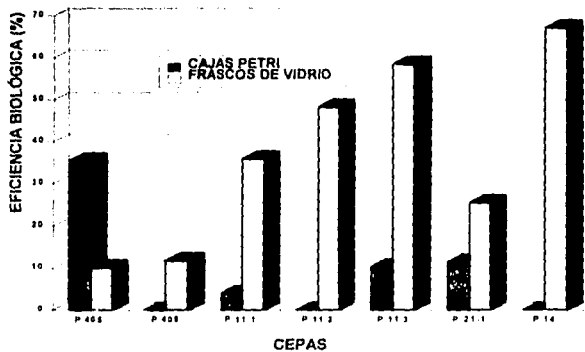
Cepas	Eficiencia biológica (%)	
	Cajas petri	Frascos de vidrio
Fructificantes		
P 405	35.4	10.14
P 409	-	11.70
Silvestres		
• Progenie de P 11		
P 11.1	4.0	35.90
P 11.2	-	48.19
P 11.3	10.2	58.34
• Componente monocariote de P 21		
P 21-1	11.4	25.36
Control		
P 14	-	66.82

La eficiencia biológica se incrementó en la siembra en frascos de vidrio con respecto a la producción en cajas petri, a excepción de la cepa P 405.

En cajas petri, solo 4 cepas presentaron fructificación. La cepa con menor eficiencia biológica fue P 11.1, con un 4 % y la cepa con mayor eficiencia biológica fue P 405 con un valor de 35.4.

En la segunda fase del experimento realizada en frascos de vidrio, 7 cepas presentaron fructificación positiva. En la cepa P 405 se observó la menor eficiencia biológica, con un valor de 10.14 %, siendo la cepa P 11.3 la que presentó la mayor eficiencia biológica, con un valor de 58.34 %, sin embargo fue superada por la cepa control P 14 con una eficiencia biológica de 66.82 %.

**GRAFICA II.** Eficiencia biológica en la primera y segunda etapa.



Con base en los resultados obtenidos se concluye que es mejor trabajar en frascos de vidrio que en cajas petri, se pierde menor humedad y el riesgo de contaminación disminuye por haber menos área de la cepa en contacto con el medio ambiente.

Por otro lado el nivel de fructificación también se vió incrementado, de las 23 cepas probadas 7 fructificaron, mientras que en cajas petri solo 4 cepas fructificaron. La eficiencia biológica también se vió incrementada en la siembra en frascos de vidrio (a excepción de la cepa P 405 cuya eficiencia biológica fue mayor en cajas petri).

A continuación se enlistan las cepas en orden decreciente de eficiencia biológica:

P 14  
P 11.3  
P 11.2  
P 11.1  
P 21-1  
P 409  
P 405

Como se puede observar la cepa control es la de mayor eficiencia biológica y la cepa con menor eficiencia es la P 405.

La eficiencia biológica de las cepas dicaríotes obtenidas por hibridación se observa en la Tabla XIX.

**Tabla XIX.** Eficiencia biológica de las cepas dicaríotes.

Cepas	Eficiencia biológica ( % )
P 405 X P409	4.87
P 409 X P 21-1	23.98
P 11.1 X P 11.3	10.78
P 11.2 X P 11.3	49.37
P 14	26.85

#### 4.1.7.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EFICIENCIA BIOLÓGICA.

El análisis de varianza indicó que existe diferencia altamente significativa en la eficiencia biológica de las 5 cepas evaluadas y también se observa que existe diferencia altamente significativa en el número de repeticiones.

Para clasificar las cepas de acuerdo a la eficiencia biológica, se aplicaron las pruebas de rango múltiple de LSD, Tukey, SNK y Duncan. La prueba de Duncan obtuvo un mayor número de grupos, por lo tanto se utilizó para interpretar los resultados. Tabla XX y Gráfica III.

**Tabla XX.** Clasificación de las cepas.

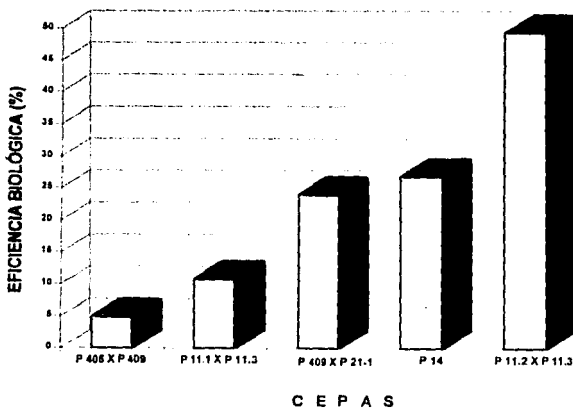
CEPAS	CLASIFICACIÓN (Prueba de Duncan)
P 405 X P 409	a
P 11.1 X P 11.3	b
P 409 x P 21-1	c
P 14	d
P 11.2 X P 11,3	e

**Nota:** Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas para un nivel de significancia al 0.05.

La diferencia altamente significativa en las repeticiones indica que para experimentos posteriores hay que incrementar el número de repeticiones.



Gráfica III. Orden creciente de eficiencia biológica de las cepas dicaríotes.



## 4.2 DISCUSIÓN.

A pesar de que las cepas presentan diámetros diferentes tanto en agar como en paja, se observa que algunas cepas siempre tienden a presentar el mismo comportamiento; es decir, cuando presentan escaso crecimiento micelial desde los primeros tiempos de incubación difícilmente llegan a mejorar su comportamiento.

Existen algunas cepas cuyo crecimiento varía totalmente de sustrato a sustrato; así, para la cepa P 416 se observa que para agar extracto de malta su crecimiento fue de intermedio a abundante y en paja de trigo no presentó desarrollo alguno.

Con respecto a los tiempos de incubación se puede concluir que tanto en agar extracto de malta como en paja de trigo, todas las cepas presentaron su máximo crecimiento micelial en el tercer período de incubación.

El análisis estadístico nos permite concluir que tres y cuatro repeticiones durante las evaluaciones de su crecimiento en agar y paja de trigo, respectivamente, fueron suficientes para este tipo de evaluación.

Las cajas petri como contenedores para la fructificación no fueron las más adecuadas, ya que se observa que la cepa control no presentó fructificación alguna.

Las condiciones manejadas tanto en cajas petri como en frascos de vidrio no llegaron a ser las óptimas, observándose que los períodos necesarios para inducir la fructificación, en algunos casos se prolongaron hasta 100 días sin presentarse cuerpo fructífero alguno. Sin embargo, es mejor contenedor el frasco de vidrio que la caja petri para inducir la fructificación, pues se incrementó el número de cepas que produjeron cuerpos fructíferos. El peso de los cuerpos fructíferos también se ve incrementado cuando se utilizan frascos de vidrio, debido a que hay mayor retención de la humedad del sustrato.

El inconveniente de trabajar en frascos de vidrio es que el área disponible para obtener cuerpos fructíferos que pueden llegar a la etapa de maduración es muy reducida, así se obtuvieron una gran cantidad de cuerpos fructíferos que por las características del contenedor no llegaban al estado de madurez o en ocasiones no era posible su cosecha.

Por lo anterior se concluye que el mejor contenedor es la bolsa de polipapel (resistente al tratamiento de esterilización), por su fácil manipulación.

Las cepas monocarióticas no son susceptibles de ser utilizadas como tales para la producción comercial del hongo, ya que cuando se sembraron en bolsas de polipapel el sustrato se deshidrató o contaminaba con mucha facilidad; además, su eficiencia biológica está muy por debajo de la presentada en las cepas comerciales.

## CAPÍTULO V

## CONCLUSIONES

De las 22 cepas estudiadas se observó que 21 crecieron sobre paja de trigo y de estas solo 6 fructificaron. Por lo tanto se puede concluir que la paja de trigo es un sustrato adecuado para el desarrollo micelial de las cepas monociarióticas a excepción de la cepa P 416, la cual, no presentó desarrollo.

Solo dos cepas monociariotes clasificadas previamente como fructificantes (P 405 y P 409), presentaron fructificación positiva.

Al observar el crecimiento micelial en agar extracto de malta, se detecta que el mayor crecimiento durante los cuatro tiempos de evaluación se presenta en las cepas P 405, P 407, P 411, P 417, P 11.3, P 21-1, P 22-2 y P 14.

En función de su crecimiento micelial se observa que las cepas inoculadas en paja de trigo P 400, P 405, P 417, P 11.3, P 21-1, P 22-2 y P 14 fueron las que presentaron el mayor crecimiento micelial en los cuatro tiempos de incubación.

Dentro del grupo de las cepas que presentaron el mayor crecimiento micelial, algunas de ellas fueron las únicas que fructificaron (P 405, P 11.3 y P 21-1). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que cepas con escaso crecimiento micelial lleguen a fructificar, tal es el caso de las cepas P409, P 11.1 y P 11.2. Así, para las cepas P 409 y P 11.1 se observa que en agar extracto de malta su crecimiento fue relativamente escaso; sin embargo, en paja de trigo mejoró su crecimiento micelial a partir del tercer tiempo de incubación y finalmente, logró fructificar. En la cepa P 11.2 se observa un mayor crecimiento micelial para ambos sustratos y se mejora a partir del segundo tiempo de incubación, observando que también es capaz de fructificar.

Es importante determinar los tipos de compatibilidad de las cepas monociarióticas que van a ser evaluadas con respecto a su capacidad para fructificar, debido a que si existe compatibilidad entre ellas se pueden cruzar durante el periodo de desarrollo micelial y resulta prácticamente imposible evaluar su capacidad individual de fructificación.

De todas las cepas que presentaron fructificación positiva durante el estudio, se observó que ninguna de ellas fue capaz de producir esporas, por lo tanto se cree que su ciclo de vida es totalmente diferente al de las cepas dicarióticas. A diferencia de las otras cepas, las cepas monociarióticas son estériles y por lo tanto, la única forma de reproducción es por su desarrollo micelial, sin que se presente recombinación genética (no hay fusión nuclear). Se piensa que su ciclo de vida parte del micelio monociariótico (proveniente del cuerpo fructífero), el cual se extiende bajo ciertas condiciones ambientales y cambios genéticos produciendo un primordio que se desarrolla hasta convertirse en cuerpo fructífero pero estéril, en el cual, no se generaron las 4 basidiosporas características de un basidiomiceto Figura 1.

## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Las condiciones ambientales y las propias para la proliferación y fructificación del hongo son sumamente importantes para lograr eficiencias biológicas estables, ya que en este caso, para la cepa control se observa que su eficiencia biológica osciló considerablemente de experimento en experimento.

Con respecto a los rendimientos obtenidos (eficiencia biológica) en las cepas monocarióticas, se observó que está muy por debajo de la presentada en las cepas comerciales. La eficiencia biológica promedio en las cepas monocarióticas osciló de 4.0 a 58.0% en tanto que la cepa control presentó una eficiencia biológica del 66.0%. Después de realizar un entrecruzamiento de las cepas monocarióticas que fructificaron se observa que su eficiencia biológica osciló de 4.0 a 49.0%, comparado con un 26% para la cepa control. A pesar de que se observa que las condiciones de cultivo no fueron las óptimas, ya que la cepa control presentó una eficiencia biológica muy baja.

El proceso de mejoramiento genético representa una alternativa para obtener cepas aptas para la producción comercial del hongo. En este proceso de mejoramiento genético es posible que se realicen entrecruzamientos entre aquellos monocariotes fructificantes que tienen la capacidad de producir gran cantidad de cuerpos fructíferos de bajo peso, con aquellas que producen pocos cuerpos fructíferos.

Finalmente, los resultados obtenidos nos permiten concluir que las cepas monocariotes no pueden ser utilizadas para la producción comercial del hongo; pero, con la simple hibridación entre monocariotes fructificantes se obtienen cepas más productivas.

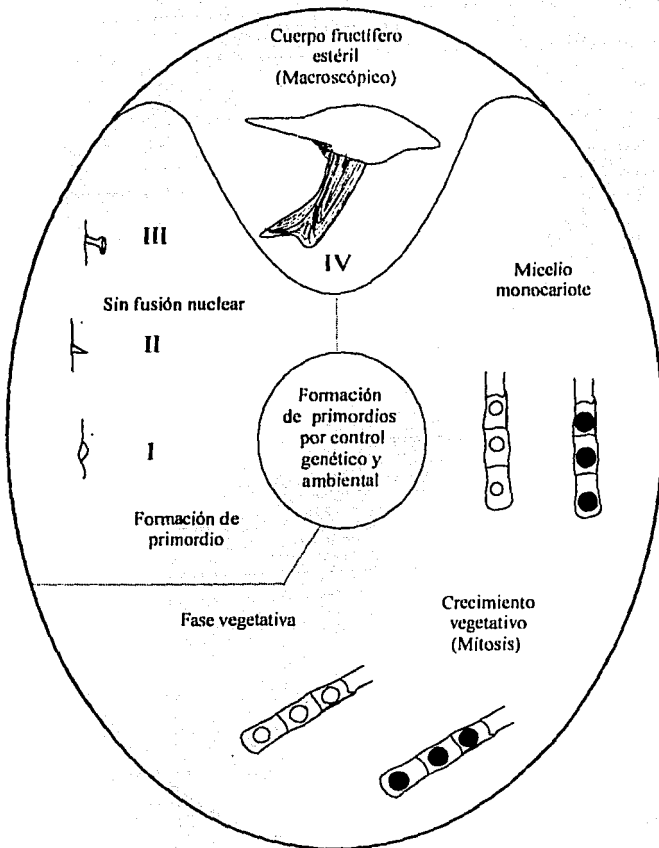


Figura 1: Probable ciclo de vida de las cepas monocariotes fructificantes de *Pleurotus ostreatus*

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Acosta-Urdapilleta, L., Bautista, R. N., Mora, V. M., López, I., Portugal, D. y Bustos, V. M., Primer cultivo de una cepa silvestre de *Pleurotus ostreatus* de México. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato; 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.
2. Acosta-Urdapilleta, L., Bustos, Z. G., y Portugal, D., "Aislamiento y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* y su cultivo en residuos agroindustriales en el Estado de Morelos". Rev. Mex. Mic. 4:13-20, 1988.
3. Alcántara, H. M., Licenciatura. Mejoramiento genético de cepas acelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*. Universidad Motolinía, A. C., Escuela de Química, México, 1990.
4. Bano, Z. y Rajarathnam, S., TROPICAL MUSHROOMS BIOLOGICAL NATURE AND CULTIVATION METHODS, Academic Press, Chang, S. T. & Quimio, T. H. (Eds.), New York, 1982.
5. Barba, Ch. J. M., Estudio fisiológico comparativo de la posible represión catabólica de *Pleurotus ostreatus* in vitro. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato; 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.
6. Becker, G., SETAS, Susaeta Ediciones S: A., España, 1992.
7. Bello, M. R., Criterios para el diseño de una planta productora de *Pleurotus*. Segundo curso de hongos comestibles. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Tapachula, Chiapas, México, Memorias, 1993.
8. Block, S., Tsao, G. y Han, L., "Production of mushroom from sawdust". J. Agric. & Food Chem. 6: 923-27, 1958.
9. Burgos, R. D., Ancona, M. L. y Guzmán, H. G., Cultivo del hongo comestible *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn y su comparación con el cultivo de *Pleurotus ostreatus* en bagazo de henequén fermentado. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato; 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.
10. Burnett, J. H., MYCOGENETICS. AN INTRODUCCION TO THE GENERAL GENETICS OF FUNGI. John Wiley & Sons., London, 1975.
11. Calvo, B. L. A., Valor Nutritivo y Toxicología de los hongos. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Tapachula, Chiapas, México, Memorias, 1993a.
12. Calvo, B. L. A., Alternativas en la conservación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*). Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Tapachula, Chiapas, México, Memorias, 1993b.



13. Chang, S. T.. Lecture of the year 1978, ASAIHL, Taiwan, China, Memorias, 1979.
14. Chang, S. T., "Sexuality and strain improvement in edible mushroom". The official publication of the Institute Mushroom Society for the tropics. Mushroom Newsletter for the tropics, 3: 1-6, 1982.
15. Chang, S. T. y Hayes, R., THE BIOLOGY AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, Academic Press, New York, E.U.A., 1978.
16. Chang, S. T. y Hayes, T. Q., TROPICAL MUSHROOMS. BIOLOGICAL NATURE AND CULTIVATION METHODS. Third printing. The Chinese University Press, Hong Kong, 1989.
17. De León, R., Morales, E., De Agreda, L. y Rolz, C., "Coffee by products and citronella bugasse as substrates for *Pleurotus* production". Mushroom Newsletter for the Tropics, 4 (1): 13-16, 1983.
18. Delgado, F. A., Licenciatura. Glosario ilustrado de los términos morfodescriptivos de los caracteres macroscópicos en el orden agaricales (basidiomicetos). UNAM, México, 1990.
19. Delmas, J., Mushroom Science X. Proceedings of the Xth. International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Memorias, Francia, 1979.
20. Eger, G., "Biology and Breeding of *Pleurotus*". THE BIOLOGY AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI. Chang, C. y Hayes, R. (Eds.), Academic Press, New York, USA, 1978a.
21. Eger, G., New ways of breeding and strain protection for practical mushroom cultivation. Mushroom Science X (Part II). Proceedings of the tenth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Francia, Memorias, 1978b.
22. Eger, G. y Leal, L. H., Somycel. Verfahren zur Dedikaryotisierung dikaryotischer Stämme von Basidiomyceten. Munich, Germany. 28 13251, 1985, 9, 1978.
23. Elliott, T. J., "Breeding strategies in *Agaricus bisporus*". Mushroom Sci. 10: 73-81, 1979.
24. Gómez, R. B. C., Licenciatura. Producción del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* sobre desechos de la industria azucarera y forestal. Facultad de Química UNAM, México, 1987.
25. Guzmán, G., IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS. Limusa, México, 1977.
26. Guzmán, G., IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS COMESTIBLES, VENENOSOS, ALUCINANTES Y DESTRUCTORES DE LA MADERA, 5ª edición, Limusa, México, 1990.
27. Guzmán, G. y Salmones, D., El cultivo de los hongos comestibles de México., Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Veracruz, México, Memorias, 1990.

28. Hernández, I. H., Los hongos comestibles en México. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Tapachula, Chiapas, México, Memorias, 1993.
29. Hernández, I. H., Sánchez, V. J. E. y Calvo, B. L. A., Aislamiento y cultivo de cepas nativas de *Pleurotus* en el Soconusco, Chiapas. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato. 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.
30. Herrera, T. y Ulloa, M., EL REYNO DE LOS HONGOS. MICOLOGÍA BÁSICA Y APLICADA, Fondo de Cultura Económica-UNAM. México, 1990.
31. Huerta, P. G., Morfología de los hongos. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Tapachula, Chiapas, México, Memorias, 1993.
32. Jablonsky, I., "Einfluss der Belichtungsintensität und anderer Faktoren des Milieus auf die Entwicklung der Fruchtkörper des Austernseitlings *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex. Fr.) Kummer. *Ceska Mykologia*. **29** (3): 140-52, 1975
33. Jandaik, C. L., Proc. First Symp. on survey and cultivation of edible mushrooms in India, Srinagar, India, Memorias, 1976.
34. Kao, K. N. and Michayluk, M. R., "A method of high-frequency inter-generic fusion of plant protoplasts". *Planta*. **115**: 355-367, 1974.
35. Keneshiro, T., "Lignocellulosic agricultural wastes degraded by *Pleurotus ostreatus*" En DEVELOPMENTS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY. Elsevier Appl. Sci., Inglaterra, 1977.
36. Kirk, T. K., Comors, W. J. y Zeikus, J. G., "Advances in understanding the microbiological degradation of lignin" THE STRUCTURE, BIOSYNTHESIS AND DEGRADATION OF WOOD. Loewus, F. A. y Runeckles, V. C. (De.), Recent Adv. Phytochem., Vol. II, Plenum Press, U. S. A., 1977.
37. Kirk, T. K., Higuchi, T. y Chang, H., "Lignin Biodegradation: summary and perspectives". In: LIGNIN BIODEGRADATION; MICROBIOLOGY, CHEMISTRY AND POTENTIAL APPLICATIONS. Vol. II CRC Press, Florida, U. S. A., 1981.
38. Kurtzman, R. H. y Zadrazil, F., "Physiological and taxonomic considerations for cultivation of *Pleurotus* mushroom". TROPICAL MUSHROOMS BIOLOGICAL NATURE AND CULTIVATION METHODS. Chang, S. T. and Quimio, T. H. (Eds.), The Chinese University Press. 299-348, 1989.
39. Lara-Herrera, I. y Mata, G., Estudio sobre la conservación y viabilidad de cepas del género *Pleurotus* en nitrógeno líquido. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato. 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.

40. Leal, L. H., PhD. Sporelessness in the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. A Genetical Study by Means of a New Dedikaryotization Method. Faculty of Pharmacy and Food Chemistry, University of Philipps, Marburg, West Germany, 1980.
41. Leal, L. H. y Ramírez, C. R. "Potencialidades del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* para el aprovechamiento de residuos agrícolas". Cuadernos de Posgrado. Alimentos y Biotecnología (UNAM). 32: 41-56, 1990.
42. Lelley, J. y Schmaus, F., "Pilzanbau". Handbuch des Erwerbsgartners Bd. 12. RFA, 1976.
43. Leong, P. C., "Cultivation of *Pleurotus* mushroom on cotton waste substrate in Singapore". TROPICAL MUSHROOMS. BIOLOGICAL NATURE AND CULTIVATION METHODS. Chang, S. T. and Quimio, T. H. (Eds.), The Chinese University Press. 349-380, 1989.
44. Little, T. M. y Hills, F. J., AGRICULTURAL EXPERIMENTATION, John Wiley and Sons, New York, 1978.
45. Martínez-Carrera, D., Morales, P., Martínez, S. W., Sobal, C. M. y Larqué, S. A., Incorporación del cultivo de hongos comestibles a las zonas rurales de México. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato. 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.
46. Martínez-Carrera, D., Morales, P. y Sobal, M., "Cultivo de diversas cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café y paja de cebada". Rev. Mex. Mic. 4: 153-160, 1988.
47. Martínez-Carrera, D., Morales, P. y Sobal, M., "Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña enriquecido con pulpa de café o paja de cebada". Micol. Neotrop. Apl. 3: 49-52, 1990.
48. Martínez, D., Quirarte, M., Soto, C., Salmones, D. y Guzmán, G., "Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agro-industriales en México". Bol. Soc. Mex. Mic. 19: 207-219, 1984.
49. Morales, P., "Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de cardamomo". Rev. Mex. Mic. 3: 71-73, 1987.
50. Omori, S., "Some discussions about the cultivation of *Pleurotus ostreatus* on sawdust bed". Mushroom Science IX, Mori H. (De). 1: 663-67, 1974.
51. Omori, S., Kanno, M. y Yoshida, E., "Studies for the utilization of waste paper II". Bulletin of the Iwate University, Japón. 8, 1977.
52. Padilla, H. F., Licenciatura. Mejoramiento genético de una mutante acetulolítica (c-) de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. Facultad de Ciencias, UNAM, México, 1990.

53. Peberdy, J. F., "Protoplast fusion - a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms". *Enzyme Microbiol. Technol.* 2: 23-29, 1980.
54. Pérez, C. C. y Alfaro, M. C., Evaluación de tres sustratos (maíz-frijol-cebada) para la producción de *Pleurotus ostreatus* y *P. djavanor* en Chapingo, México. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato. 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.
55. Rajarathnam, S. y Bano, Z., "Biological Significance of the natural cellulosic wastes degraded by *Pleurotus* mushrooms". *Indian Mushroom Science II. Biochemistry and Physiology*, 1983.
56. Ramírez, C. R., Maestría. Producción y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. UNAM, México, 1989.
57. Raper, J. R., GENETICS OF SEXUALITY IN HIGHER FUNGI. The Ronald Press Co., New York, 1966.
58. Rodríguez, H. M., Soto-Velazco, C., Alonso, B. W., Villaseñor, I. L., Camino, V. M. y Guzmán-Dávalos, L., Evaluación de las cepas de *Pleurotus* en relación con las condiciones ambientales. I. Temp., Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato. 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.
59. Salmones, D., Mata, G. y Guzmán, G., Estudio sobre la obtención de cepas dicarióticas de *Pleurotus* y su evaluación en planta piloto. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato. 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.
60. Sánchez, V. J. E., Generalidades sobre los hongos. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. Tapachula, Chiapas, México, Memorias, 1993a.
61. Sánchez, V. J. E., Tecnología para la producción de *Pleurotus*. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Tapachula, Chiapas, México, Memorias, 1993b.
62. Sánchez, V. J. E., Experiencias locales en la implementación de plantas productoras de *Pleurotus*. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Tapachula, Chiapas, México, Memorias, 1993c.
63. Sánchez, V. J. E. y Calvo, B. L. A., Producción de hongos comestibles en condiciones rústicas bajo un cacaotal utilizando mazorca de cacao como sustrato. 11th International Cocoa Research Conference. Cocoa Producers Alliance, Memorias, Ivory Coast, 1993.
64. Sánchez, V. J. E. y Calvo, B. L. A., Uso de inóculo líquido en la producción de *Pleurotus ostreatus*. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato. 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.

65. Sobal, M. y Martínez-Carrera, D., "Potencial de entrecruzamiento de diferentes cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus* aisladas a partir de diversos sustratos". Mic. Neotrop. Applic. 1:21-27, 1988.
66. Soto-Velazco, C., Guzmán-Dávalos, L. y Rodríguez, O., "Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de maguey tequilero fermentado y mezclado con paja de trigo". Rev. Mex. Mic. 5: 97-101, 1989.
67. Trease, G. E. y Evans, W- C. TRATADO DE FARMACOGNOSIA, Decimosegunda edición, Nueva Editorial Interamericana, México, 1988.
68. Villegas de Gante, A. y Pérez, G. E. a., Una aproximación al sector productor de setas (*Pleurotus sp.*) en México. Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato. 5º Congreso Nacional de Micología, México, Memorias, 1994.
69. Zadrazil, F., The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus eryngii*. Mushroom Science IX (part Y). Proceedings of ninth International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi, Tokyo, Japón, Memorias, 1974.
70. Zadrazil, F., "Influence of CO<sub>2</sub> concentration on the mycelium growth of three *Pleurotus* species. European J. Appl. Microbio. Biotechnol. 1: 327-335, 1975.