

302827

29



**UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.**

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA UNAM

**MEJORAMIENTO GENETICO DE CEPAS  
ACELULOLITICAS DE Pleurotus ostreatus**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**MIREYA ALCANTARA HERNANDEZ**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## INDICE

	Página
I INTRODUCCION	1
1.1 HIPOTESIS.	5
1.2 OBJETIVO.	6
II INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA	7
2.1 ESQUILMOS AGRICOLAS.	7
2.1.1 Importancia de los esquilmos agrícolas y su utilización.	7
2.1.2 Estructura física y química del material lignocelulósico y de sus componentes.	13
2.1.3 Métodos utilizados para aumentar la digestibilidad de los desperdicios agrícolas.	18
2.1.4 Degradación de la lignina por microorganismos.	19
2.2 <u>Pleurotus ostreatus</u> .	20
2.2.1 Características generales.	20
2.2.2 Ciclo de vida.	20
2.2.3 Requerimientos nutritivos.	23
2.2.4 Requerimientos ambientales.	24
2.2.5 Importancia comercial.	25
2.2.6 Características sensoriales.	27
2.2.7 Valor nutritivo.	28
2.2.8 Efectos del almacenamiento sobre la calidad del producto.	30

III	PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1	DIAGRAMA.	31
3.1.1	Mejoramiento genético.	31
3.1.2	Preparación del inóculo de grano.	32
3.1.3	Preparación del sustrato para evaluar los patrones de consumo de los dicariotes acelulolíticos.	33
3.1.4	Evaluación de los patrones de consumo de los dicariotes acelulolíticos sobre los componentes del sustrato.	34
3.2	MATERIAL Y EQUIPO.	35
3.3	METODOLOGIA.	35
3.3.1	Mejoramiento genético.	35
3.3.1.1	Evaluación de los patrones de consumo de los dicariotes acelulolíticos sobre el sustrato.	36
3.3.2	Determinaciones analíticas.	36
	Cenizas.	36
	Lignina.	36
	Extracción de carbohidratos.	37
	Glucanos.	38
	Xilanos.	39
3.4	EXPERIMENTOS Y RESULTADOS.	41
3.4.1	Apareamiento entre monocariotes compatibles con diferente capacidad de consumir celulosa.	42

3.4.2	Selección de los dicariotes acelu- lolíticos.	42
3.4.2.1	Medio de sales minerales-carboxi- metilcelulosa (SM-CMC).	42
3.4.2.2	Medio de extracto de malta depro- teinado-carboximetilcelulosa - (DPMA-CMC).	43
3.4.3	Evaluación de los patrones de consumo de la lignocelulosa por dicariotes acelu- lolíticos.	44
IV	DISCUSION	69
V	RESUMEN	75
VI	CONCLUSIONES	76
	BIBLIOGRAFIA	78
	APENDICE	83
8.1	MATERIAL Y EQUIPO.	83
8.1.1	Medios de cultivo.	83
8.1.2	Reactivos analíticos.	83
8.1.3	Material de laboratorio.	84
8.1.4	Equipo.	85
8.2	CEPAS FUNGICAS.	85
8.3	MEDIOS DE CULTIVO.	86
8.3.1	Medio de agar extracto de malta.	86
8.3.2	Medio de agar extracto de malta deproteinado (DPMA).	86
8.3.3	Medio de doble capa para definir el carácter acelu- lolítico.	87

8.3.4	Medio de grano estéril para la producción del inóculo.	89
8.3.5	Sustrato de paja para evaluar el consumo de la lignocelulosa.	90
8.4	CALCULOS PARA OBTENER LA COMPOSICION DEL SUSTRATO EXPRESADA EN BASE CONSTANTE (CENIZAS) Y LOS PORCENTAJES DE DEGRADACION DE CADA COMPONENTE.	91

# INTRODUCCION

## INTRODUCCION

Los esquilmos agrícolas integran el mayor volumen de los desperdicios generados por la actividad humana. Los residuos de la cosecha de granos igualan o exceden el volumen del producto comestible. En México la producción de estos materiales se encuentra alrededor de 66 millones de toneladas anuales, por lo que estos residuos constituyen una fuente de recursos renovables que es necesario utilizar. Actualmente la cantidad de residuos generada es mucho mayor a la que puede ser utilizada eficientemente en la localidad y el tirar los residuos ha sido la opción más barata, y por lo tanto la más favorecida, con el subsecuente efecto nocivo sobre el medio ambiente (28).

A pesar de las diversas tecnologías existentes para el aprovechamiento de dichos materiales, su utilización ocasiona un gasto extra con pequeño retorno a la inversión y por eso no se lleva a efecto de manera generalizada. Por ello es necesario un cambio de actitud, es decir, en lugar de que los residuos sean considerados como un desperdicio no deseado, éstos deben ser vistos como parte integral del sistema de producción de alimentos (28).

Una de las razones del bajo aprovechamiento de la mayor parte de los esquilmos agrícolas es que uno de sus constituyentes es un polímero difícil de degradar, como es la lignina.



La asociación íntima de la lignina con la celulosa limita la utilización directa de los desechos lignocelulósicos en la alimentación animal. A ello se debe que la lignina presente en los desechos vegetales impide que sean usados como forraje ya que su digestibilidad disminuye conforme aumenta el contenido de lignina (28).

Si se pretende ampliar la utilización de los desechos lignocelulósicos, es necesario disminuir su contenido de lignina. Se han estudiado diferentes métodos para degradar la lignocelulosa; entre ellos se pueden mencionar los físicos, los químicos y los microbiológicos, aunque ninguno de ellos ha tenido éxito a nivel industrial, sin embargo los métodos microbiológicos han despertado recientemente grandes expectativas para su aplicación práctica.

En los últimos años se ha obtenido información sobre el tipo de organismos capaces de degradar la lignina, así como de algunos de los factores que controlan este proceso en la naturaleza; como resultado de estos estudios se ha visto que únicamente ciertos hongos son capaces de atacar a la lignina. Estos hongos son clasificados dentro de dos categorías: hongos de la pudrición oscura y hongos de la pudrición blanca. Esta denominación está basada en los cambios físicos, en particular al cambio en color que sufre la madera como resultado de la acción de estos hongos. En términos generales, los hongos de pudrición oscura ocasionan únicamente cambios menores en la estructura de la lignina, y por ello queda la madera de color oscura, y los de pudrición blanca

son capaces de degradarla completamente, así al permanecer la celulosa en el sustrato, adquiere un color blanco (20). El mecanismo preciso con que este biopolímero es degradado no se conoce con exactitud.

A pesar de los estudios que se han realizado hasta la fecha, no han sido obtenidas las cepas ni las condiciones que permitan inducir una alta delignificación selectiva (9). La biodegradación de la lignina ha sido relativamente poco estudiada. La mayoría de las investigaciones en esta área están caracterizadas por un enfoque fuertemente bioquímico, como son los cambios producidos por diferentes tipos de hongos sobre algunos compuestos aromáticos y varios tipos de ligninas purificadas (3).

Hasta la fecha no se ha realizado ningún esfuerzo para obtener información sobre el mecanismo genético que controla la producción del sistema enzimático para la degradación de la lignina, a pesar de la gran importancia de este mecanismo, tanto en los aspectos científicos básicos, como en los de aplicación práctica de estos conocimientos. Por ello, el desarrollo de una metodología que permita la utilización de los residuos lignocelulósicos a nivel comercial resulta inconcebible sin dicha información (5).

Por las razones anteriores, se decidió estudiar el mejoramiento genético para la degradación de la lignocelulosa utilizando a los basidiomicetos como modelo experimental (5).

La falta de investigación sobre la degradación de la lignina se debe a que la manipulación genética de los basidiomicetos presenta serias dificultades, algunas de ellas son: numerosos basidiomicetos tienen requerimientos nutritivos complicados, lo que hace que su cultivo en el laboratorio sea muy problemático. La mayoría de los basidiomicetos son de crecimiento muy lento, y no es posible obtener generaciones en plazos cortos, como sucede con las bacterias. Los basidiomicetos son muy susceptibles a ser contaminados con mohos que pueden crecer rápidamente en los medios usados. Otro factor que ocasiona un mayor grado de dificultad en el manejo de estos hongos, es la complejidad de sus reacciones sexuales. Así mismo, frecuentemente su ciclo de vida no puede ser completado en el laboratorio, ya que muchas veces se requieren condiciones ambientales muy específicas para inducir los estadios finales de su desarrollo sexual (24).

Dentro de los diferentes tipos de hongos de la pudrición blanca, se seleccionó al hongo comestible Pleurotus ostreatus para estudiarlo en este trabajo, debido a sus características genéticas y fisiológicas o nutritivas que permiten que las dificultades antes mencionadas disminuyan a un mínimo. Por ejemplo, Pleurotus ostreatus se encuentra dentro de los hongos superiores que han sido estudiados genéticamente (2, 3 y 25). Estos estudios indican que la manipulación genética de este organismo es posible y no tan complicada.

Otro aspecto tomado en cuenta para la selección de Pleurotus ostreatus, es su capacidad para degradar lignina selectivamente

(22). Desde hace tiempo se sabe que entre los hongos de pudrición blanca existen diferencias respecto a su capacidad para atacar selectivamente a la lignina o los polisacáridos vegetales (16 y 22). Recientemente se han desarrollado pruebas que permiten identificar a los hongos de pudrición blanca que degradan selectivamente lignina, habiéndose reportado que Pleurotus ostreatus se encuentra dentro de ellos (2 y 3).

### 1.1 HIPOTESIS

Con el presente trabajo se espera corroborar si las 2 mutantes acelulolíticas (C-) obtenidas a la fecha se encuentran mutadas en el mismo grupo de genes. Para ello se hibridizaron monocariotes progenie de tipo (C-) provenientes de las 2 mutantes (C-) disponibles. Si como resultado de estos apareamientos siempre se obtienen dicariotes (C-), será posible concluir que las alteraciones presentes en ambas mutantes se llevaron a cabo en genes idénticos tanto en tipo como en número.

Con un procedimiento de selección genética de cepas con una característica genética particular es posible enriquecer o aumentar la posibilidad de obtener cepas con un vigoroso crecimiento micelial, así como obtener algunos dicariotes (C-) que presenten un consumo más selectivo de la lignina y en donde al mismo tiempo se acentuara su carácter acelulolítico.

Considerando que los monocariotes (C-) disponibles provienen de progenies diferentes en donde el único parámetro en común para su selección fué el carácter (C-), es de esperarse que dentro de

las nuevas combinaciones, se obtengan dicariotes (C-) que presenten un consumo más selectivo de la lignina, y al mismo tiempo se acentúe su carácter acelulolítico. Sin embargo, también es posible que se obtengan cepas donde los patrones de consumo sean semejantes a las cepas originales, o bien que pierdan selectividad en el consumo de lignina.

## 1.2 OBJETIVO

El presente trabajo esta ubicado dentro de un proyecto global que pretende desarrollar un proceso de delignificación selectiva por medio de cepas mejoradas de Pleurotus ostreatus. Se espera que con un proceso de este tipo será posible aprovechar algunos esquimos agrícolas de manera integral ya que se contaría tanto con la producción de esporoforos para el consumo humano y con la posibilidad de utilizar el sustrato residual ya delignificado en la alimentación de rumiantes. Para lograr este objetivo se requieren cepas con un crecimiento micelial vigoroso y una alta productividad de esporoforos.

Hasta la fecha varias etapas de este proyecto global se han completado: Se han producido mutantes (C-), y algunos de ellos se han mejorado genéticamente; sin embargo el desarrollo micelial de la mayoría de estas mutantes es todavía muy pobre.

El presente trabajo se planteó entonces como objetivo manipular genéticamente las mutantes acelulolíticas disponibles para obtener dicariotes con un vigoroso crecimiento micelial y de ser posible con mayor selectividad para degradar lignina.

**INFORMACION GENERAL  
SOBRE EL TEMA**

## INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

### 2.1 ESQUILMOS AGRICOLAS.

#### 2.1.1 Importancia de los esquilmos agrícolas y su utilización.

La situación mundial presente se caracteriza por una crisis generalizada en la distribución de alimentos, en particular de los de tipo energético, simultáneamente a una creciente necesidad de preservar el medio ambiente. La situación es más patente en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo, en donde además su productividad agrícola es muy inferior a los rendimientos obtenidos por los países industrializados (15), lo que aunado a las altas tasas de crecimiento demográfico ha causado un deterioro gradual de su situación alimentaria. Por ello, estos países importan cantidades considerables de productos alimenticios para cubrir sus necesidades básicas. Por otro lado, actualmente los subproductos agrícolas y forestales representan para estos países un potencial alimentario desaprovechado. En la mayoría de los cultivos agrícolas el producto cosechado representa sólo el 30% de la biomasa total producida y las pérdidas del material cosechado se acercan a un 50% (38), mientras que con la actividad forestal la producción de biomasa desperdiciada es todavía mucho mayor. En México la producción de cereales se encuentra alrededor de los 15 millones de toneladas anuales (Tabla I) (16). Mientras que la producción anual de los principales residuos agrícolas alcanza los 68 millones de toneladas (13) (Tabla II).

**TABLA I. PRODUCCION NACIONAL DE CEREALES PARA 1988.**

<b>CEREAL</b>	<b>TOTAL DE LA COSECHA</b> <b>(Toneladas)</b>
MAIZ	9 642 900
TRIGO	3 428 102
SORGO	1 771 242
ARROZ	<hr/>
<b>TOTAL</b>	<b>14 835 267</b>

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA, GEOGRAFIA E INFORMATICA (1988).



**TABLA II. PRODUCCION NACIONAL DE ESQUILMOS AGRICOLAS  
PARA 1988.**

<b>ESQUILMO AGRICOLA</b>	<b>PRODUCCION (Toneladas)</b>
BAGAZO DE CANA	27 622 056
RASTROJO DE MAIZ	24 060 871
PAJA DE SORGO	3 894 949
PAJA DE TRIGO	2 931 863
OLOTE	2 861 866
VARA DE ALGODON	735 920
PAJA DE FRIJOL	685 750
PAJA DE ARROZ	683 722
PAJA DE CEBADA	398 531
PAJA DE CARTAMO	222 417
PAJA DE SOYA	153 887
PAJA DE AJONJOLI	23 508
<b>TOTAL</b>	<b>66 275 340</b>

DIRECCION GENERAL DE APROVECHAMIENTOS FORESTALES, (1989).

De acuerdo con el análisis previo, en la mayoría de los cultivos cerca de la mitad de la biomasa total producida permanece desaprovechada (31), lo que resulta en una acumulación periódica de cantidades considerables de desperdicios vegetales a causa del carácter cíclico de la agricultura. Debido a que los procesos de degradación natural no pueden funcionar con efectividad en las situaciones en que los desperdicios agrícolas y forestales son producidos y acumulados, éstos han llegado a convertirse incluso en un peligro para el equilibrio ecológico. Estos son generalmente considerados como basura y tirados en ríos y lagos o a terrenos baldíos potencialmente agrícolas, lo que da lugar a fuentes de contaminación e insalubridad. La oficina de Industria y Medio Ambiente del Programa de las Naciones Unidas publicó un documento sobre el aprovechamiento de esquilmos agrícolas y forestales (16). En la Tabla III se resumen las tecnologías aplicadas a los esquilmos agrícolas y forestales. La selección de una u otra de las tecnologías mencionadas dependerá de la cantidad y de las características de los residuos disponibles, la posibilidad de utilizar dicha tecnología, el mercado de los productos finales y de consideraciones técnicas, económicas y sociales.

El desarrollo de tecnologías que usen estos materiales de desecho para incrementar la producción de alimentos básicos es de interés primordial. Esto resolvería los problemas ecológicos mencionados además de aumentar el rendimiento económico de la agricultura. Los alcances de dicha tecnología serían todavía mucho mayores puesto que se tendría acceso a los vastos productos

**TABLA III. TECNOLOGIAS PARA EL APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGRICOLAS Y FORESTALES.**

<p><b>GENERACION DE ENERGIA</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- COMBUSTION DIRECTA</li> <li>- BIOGAS</li> <li>- ETANOL</li> </ul>
<p><b>APLICACION A LA TIERRA</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- FERTILIZANTES</li> <li>- ACONDICIONADORES DEL SUELO</li> </ul>
<p><b>ALIMENTACION ANIMAL</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ALIMENTACION DIRECTA</li> <li>- FERMENTACION</li> </ul>
<p><b>MATERIALES DE CONSTRUCCION</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TABLEROS</li> <li>- PAPEL</li> </ul>

LOWE C.B., (1982).

vegetales generados continuamente como resultado de la actividad fotosintética de las plantas, permitiendo una utilización más completa y racional. El volumen de estos recursos es considerable; se calcula que la biomasa total producida fotosintéticamente sobre la superficie terrestre sobrepasa las  $10^{10}$  toneladas por año (40). De éstas tan sólo 10% de la biomasa es sintetizada por los cultivos, mientras que un 75% se produce en las zonas boscosas (5).

A pesar de los usos potenciales tan extensos de los subproductos lignocelulósicos, en la actualidad sólo son utilizados en una fracción muy pequeña. Entre los principales usos está: la fabricación de materiales de construcción (tableros), en la industria de papel son quemados para generar energía, también son utilizados en la alimentación de ruminantes, en el campo como abono orgánico, para el relleno de terrenos o bien tirados en campos cercanos al sitio de producción. Sin embargo, la cantidad de residuo generado es mucho mayor al que puede ser utilizado eficientemente en la localidad, y por lo tanto su acumulación favorece un desequilibrio sobre el medio ambiente (29).

Hasta la fecha no se ha logrado desarrollar un proceso práctico, a pesar de las numerosas investigaciones orientadas hacia el desarrollo de tecnologías para la utilización de materiales lignocelulósicos. Esto se debe a varios factores de suma importancia. Uno de ellos es el carácter disperso de su producción, lo que aunado a su baja densidad, ocasiona que los

costos de transporte se conviertan en una de las variables más importantes que afectan a la economía del proceso. Este factor adquiere todavía mayor importancia al considerar plantas industriales de gran capacidad que siguen el enfoque de llevar el sustrato al proceso, teniéndose así que transportar cantidades enormes de sustrato. Dada la dispersión en la generación de los desechos agrícolas, la aplicación de un proyecto implica un cambio de enfoque, que consistiría en llevar el proceso al sustrato. Para esto se requiere una tecnología alternativa, susceptible de ser implantada en pequeños módulos en el campo después de la cosecha; debe ser simple, de fácil operación y requerir de poco capital. Sus repercusiones socioeconómicas serían decididamente positivas para el medio rural, pues los mismos campesinos podrían procesar sus desechos y ocuparse en una actividad económicamente redituable durante el periodo entre cosechas. Desde este punto de vista las tecnologías a gran escala no son tan atractivas ya que crean muy pocas fuentes de trabajo en comparación con el alto costo de inversión y, además, el alto grado de complejidad tecnológica de tales procesos exige mano de obra con cierto nivel de especialización (27).

#### 2.1.2 Estructura física y química del material lignocelulósico y de sus componentes.

El material lignocelulósico está constituido típicamente, por los polisacáridos celulosa, hemicelulosa y lignina, siendo éste último el principal componente estructural de la pared

celular de las plantas. El contenido de celulosa varía de 40 a 60%, el de hemicelulosa de 15 a 50% y el de lignina de 10 a 30% dependiendo del tipo de vegetal, del tejido y de la edad del mismo (12).

Los tejidos vegetales presentan una organización celular bastante uniforme (Figura 1). Una pared celular típica está constituida por una laminilla media, una pared primaria y otra secundaria; esta última compuesta, a su vez, por tres capas:  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  (11). Por lo general la capa  $S_2$  es la de mayor espesor comparada con la pared primaria, la laminilla media y las otras dos capas ( $S_1$  y  $S_3$ ). En la laminilla media se encuentra casi toda la lignina, cuya proporción disminuye conforme se acerca al lumen. La pared secundaria contiene muy poca lignina, está constituida principalmente por polisacáridos. A cada capa de la pared secundaria se adhieren la celulosa y cantidades mínimas de otros constituyentes formando estructuras longitudinales llamadas microfibrillas, dentro de cada una de las cuales se encuentran las moléculas lineares de celulosa unidas lateralmente por puentes de hidrógeno y por fuerzas Van der Waals (10).

Los grados de ordenamiento de las moléculas de celulosa difieren; cuando están altamente ordenadas se les conoce como cristalinas, y las regiones con menor grado de ordenamiento se denominan amorfas (Figura 11). Dentro de la pared secundaria, la lignina está concentrada en los espacios localizados entre las microfibrillas, las regiones amorfas y los cristales entre cristales de celulosa. Se sugiere que la asociación de la celulosa con la lignina es en gran parte física, formando un

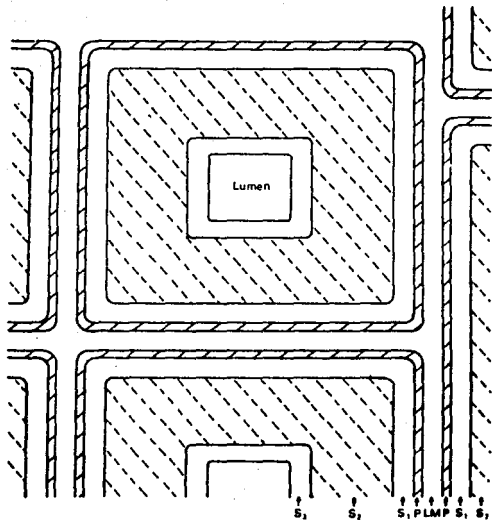


Figura I. Pared celular típica del tejido vegetal con laminilla media (LM). Pared primaria (P) y Pared secundaria constituida por capa exterior ( $S_1$ ), capa central ( $S_2$ ) y capa interior ( $S_3$ ). Crowling B.E. (1961).

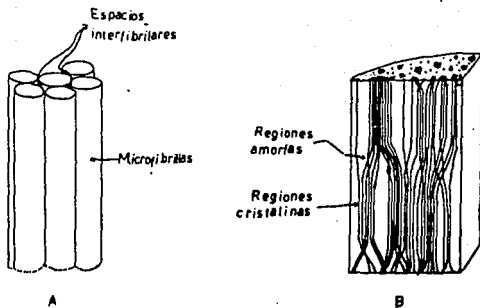


Figura II. (A) Microfibrillas que componen las capas de la pared secundaria.  
 (B) Microfibrillas mostrando las moléculas de celulosa asociadas en diferentes grados de ordenación.  
 Crowling B.E. (1961).



sistema de entrecruzamiento de polímeros. Esta íntima asociación física se considera responsable de su resistencia a la degradación biológica. En las regiones amorfas, entre cristales de celulosa, se encuentra también hemicelulosa, minerales y otros materiales como grasas, ceras, aceites esenciales, taninos, resinas, carbohidratos solubles y proteínas (10).

La celulosa es un polisacárido de alto peso molecular formado por unidades de D-glucosa con uniones  $\beta$ -1-4-glucosídicas, con las unidades de glucosa en conformación de silla y los grupos hidróxilo en la posición ecuatorial estable (10). La molécula es alargada y plana, sin ramificaciones, identificándose químicamente tres tipos de celulosa:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ -celulosa.

La hemicelulosa, según su composición química, se presenta con cuatro tipos de estructuras: xilanos,  $\beta$ -mananos, galactanos y L-arabinanos. Los constituyentes principales de la hemicelulosa en los residuos lignocelulósicos son los xilanos, tales como 4-orto-metil-glucuronoxilanos y los arabino-4-orto-metilglucuronoxilanos y  $\beta$ -mananos, tales como gluco y galacto-glucomananos (10).

La lignina es considerada como un material incrustante ya que es el último componente sintetizado por el tejido vegetal; su producción aumenta conforme envejece la planta. Es un polímero estructural de las plantas vasculares formado por unidades de fenil propano, proporciona a las plantas rigidez y unión entre sus células, además de disminuir la permeabilidad al agua a

traves de las paredes celulares (37).

La formación de lignina en los tejidos vegetales es sumamente compleja y no totalmente entendida; comprende varias etapas, tanto de reacciones puramente químicas como enzimáticas a partir de precursores primarios, todos del tipo alcoholes de fenil propano. En consecuencia, la molécula de lignina presenta una estructura ramificada e irregular (3).

### 2.1.3 Métodos utilizados para aumentar la digestibilidad de los desperdicios agrícolas.

En los últimos años, diversos grupos de investigadores han estudiado el problema, se ha tratado de aumentar la biodisponibilidad de la celulosa utilizando tratamientos físicos, químicos y microbiológicos o combinaciones de éstos. Cabe mencionar que en algunos casos además de la lignina, pueden existir otros compuestos químicos que sea necesario eliminar por lo que amerita el empleo de más de un sistema de pretratamiento (1). Es indudable que la selección de uno u otro tratamiento dependerá de la composición química del residuo y de la calidad del producto final que se desee obtener, del lugar en donde se localice la planta industrial, de la capacidad de la misma y de un análisis de las ventajas y desventajas de un procedimiento dado, todo aunado al factor económico.

Uno de los principales factores que han dificultado el estudio de los mecanismos enzimáticos de la biodegradación de la lignina, es la diferencia que existe entre su degradación y la

de otros biopolímeros. Algunos de los obstáculos presentes en la lignina es que no posee unidades repetitivas unidas por enlaces fáciles de hidrolizar y su degradación es relativamente lenta (41). Por ello se han tratado de encontrar las condiciones óptimas de cultivo bajo las cuales se efectúe una rápida degradación y se produzca mayor cantidad de enzimas degradadoras de lignina, sin mucho éxito.

#### 2.1.4 Degradación de la lignina por microorganismos.

Los únicos microorganismos capaces de atacar a la lignina son los llamados hongos de pudrición oscura y blanca.

Los hongos de pudrición oscura, atacan principalmente a los polisacáridos de la madera, pero de manera mínima a la lignina. El ataque de este tipo de hongos a la pared celular de la madera empieza con una metabolización de las sustancias de la capa  $S_2$  en la pared secundaria. La capa  $S_1$ , la pared primaria y la laminilla media son por el contrario bastante resistentes a la degradación debido a su alto contenido de lignina (11 y 32). Organismos de este tipo son: Poria monticola, Lenzites trabea y Lentinus lepideus (20 y 21).

Los hongos de pudrición blanca, son capaces de atacar tanto a la lignina como a los polisacáridos de la madera, es decir la celulosa y hemicelulosa. En base a la capacidad de éstos, por atacar diferentes componentes de la lignocelulosa, se les ha clasificado en dos diferentes grupos (20):

a) Los que degradan los tres componentes de la madera simultáneamente. Organismos de este tipo son: Polyporus versicolor y Lentinus nigripes.

b) Aquéllos en los que la degradación de lignina es más rápida, que la degradación de celulosa y hemicelulosa. Organismos de este tipo son: Polyporus Berkeleyi, Forges uisarius y Pleurotus ostreatus.

## 2.2 Pleurotus ostreatus.

### 2.2.1 Características generales.

El hongo Pleurotus ostreatus es uno de los más importantes que prospera en los residuos agroindustriales. Se desarrolla abundantemente sobre la pulpa de café, el bagazo de caña de azúcar y el henequén entre otros materiales. Es una especie comestible y susceptible de ser cultivado a escala industrial, lo que proporciona una alternativa excelente para manejar y utilizar en forma más racional los desechos agrícolas en México (31).

### 2.2.2 Ciclo de vida.

Este hongo ofrece una potencialidad para el desarrollo de un proceso industrial de delignificación, ya que pertenece a los que degradan lignina con mayor porcentaje y rapidez. Debido a que Pleurotus ostreatus es comestible, las potencialidades para su uso industrial son mucho mayores, además de evitarse los

posibles problemas toxicológicos. Una vez delignificado el sustrato, éste podría ser utilizado en la alimentación animal ya que se convierte en un material rico en celulosa y hemicelulosa.

Pleurotus ostreatus es uno de los hongos de la pudrición blanca, que ha sido más estudiado genéticamente; de estos estudios se ha concluido que es factible de manipularlo genéticamente. El mejoramiento genético se puede llevar a cabo por hibridaciones (25).

Pleurotus ostreatus pertenece a la clase de los basidiomicetos, éstos se diferencian de los demás hongos en que producen sus esporas en sitios especializados llamados basidios, a diferencia de los ascomicetos que los producen en unas estructuras llamadas ascas. El micelio de la mayoría de los basidiomicetos pasa por tres estados distintos de desarrollo; primario, secundario y terciario, para que el hongo complete su ciclo de vida (Figura III). El micelio primario generalmente se desarrolla a partir de la germinación de la basidiospora. Al principio puede ser multinucleada ya que el núcleo o los núcleos de la basidiospora se dividen muchas veces a medida que el tubo germinativo emerge de la espora y comienza a crecer sin producir septas. La fase multinucleada es corta porque pronto se forman tabiques que dividen al micelio en células uninucleadas. El micelio secundario se origina del micelio primario. Las células son típicamente binucleadas. El estado binucleado comienza cuando se fusionan los protoplastos de dos células uninucleadas, sin que haya meiosis después de la mitosis. La célula binucleada que así se forma produce una ramificación a la cual emigra el par

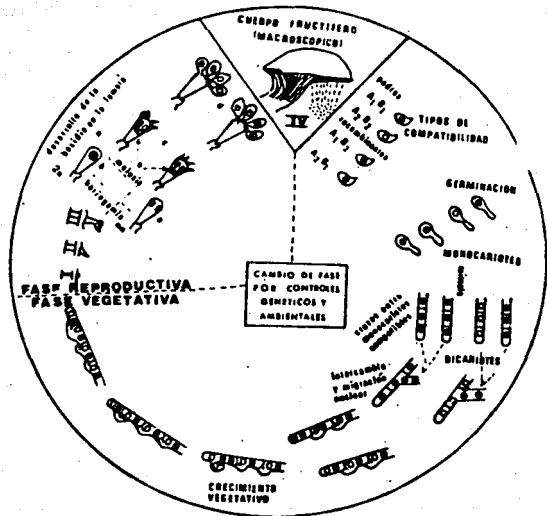


Figura III. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*.

nuclear; los dos núcleos se dividen conjugadamente, 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 esporóforos de los basidiomicetos. Los basidiomicetos producen basidios en cuerpos fructíferos altamente organizados de varios tipos. El basidio se origina como célula terminal de una hifa binucleada y se encuentra separado de la misma por un tabique a cuyo lado generalmente se encuentra una fíbula. Al principio el basidio es angosto y corto, pronto se agranda y se hace más ancho. En tanto tienen lugar estos cambios externos, dentro del basidio joven se fusionan los núcleos (kariogamia) y el núcleo cigótico pronto sufre meiosis, dando lugar a cuatro núcleos haploides. Entre tanto emergen cuatro esterigmas en el extremo del basidio y sus extremos se agrandan para formar los esbozos de las basidiosporas. Los cuatro núcleos pasan a los jóvenes basidiosporas, que van a completar su desarrollo como células uninucleadas haploides (1, 25 y 35).

### 2.2.3 Requerimientos nutritivos.

La mayoría de los microorganismos heterótrofos son capaces de obtener los átomos de carbono, necesarios para su nutrición, a partir de carbohidratos de bajo peso molecular. La dificultad de asimilación se ve incrementada con los polisacáridos: almidón,

celulosa, hemicelulosa, pectinas, etc. La lignina, compuesto abundante en la naturaleza y asociado generalmente a la celulosa, como ya se mencionó anteriormente, es de difícil degradación. El humus de los bosques, por ejemplo, es un complejo formado por lignina, celulosa y hemicelulosa. Pleurotus ostreatus se caracteriza porque en su fase vegetativa metaboliza preferentemente lignina (26).

El nitrógeno puede ser asimilado por los organismos en diferentes formas como nitrógeno amoniacal o como nitrógeno orgánico presente principalmente en las proteínas o bien en los ácidos nucleicos. Pleurotus ostreatus requiere de bajos niveles de nitrógeno para su desarrollo y asimila en forma más efectiva el nitrógeno orgánico presente en las proteínas que contiene el sustrato; éstas son producto de la fermentación a través de la multiplicación y muerte sucesiva de diversas poblaciones microbianas.

Todas las poblaciones microbianas requieren minerales en mayor o menor grado, aunque pocas veces se requiere suministrarlos a medios de cultivo definidos por considerarse que las cantidades necesarias están cubiertas por los minerales que contiene la materia prima.

#### 2.2.4 Requerimientos ambientales.

En el proceso de producción de Pleurotus ostreatus, las condiciones ambientales tienen una importancia fundamental. La productividad depende de un adecuado control de la temperatura,



del pH, de la humedad (tanto del medio ambiente como del sustrato) así como, de los niveles de aireación. En la naturaleza estas condiciones se dan sólo en determinadas regiones geográficas y durante ciertas épocas (26).

TEMPERATURA. Pleurotus ostreatus crece a una temperatura óptima de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante su fase vegetativa y durante la fase de fructificación esta disminuye a  $18-22^{\circ}\text{C}$ .

AGUA. El sustrato o medio de cultivo debe contener más de 50% de agua; la humedad óptima oscila entre 65 y 70%, mientras la del aire debe fluctuar entre 90 y 95%.

OXIGENO. Por ser Pleurotus ostreatus un organismo aerobio requiere de oxígeno para su respiración y el aire es el medio adecuado para su suministro. Durante la fase vegetativa el  $\text{CO}_2$  inhibe la fructificación; ya que se produce en mayor cantidad, mientras que en la fase de fructificación el porcentaje de  $\text{CO}_2$  disminuye permitiendo el crecimiento de primordios.

pH. El pH óptimo del sustrato es 7.0, es decir un medio neutro.

#### 2.2.5 Importancia comercial.

El consumo de los hongos comestibles como fuente de alimento es muy antiguo. Dos especies, Lentinus edodes y Volvariella volvacea, se consumen desde hace más de 2 000 años en los países asiáticos como producto de un cultivo artificial (26). Por otro lado la especie más ampliamente cultivada en la actualidad y de

mayor importancia comercial hoy en día es Agaricus bisporius con una producción anual de 1,227,000 toneladas en 1986. El volumen de producción de Shiitake u hongo japonés también es importante (314,000 toneladas/anuales) aunque su consumo no es tan generalizado como el del champiñón, siendo Japón el principal centro de consumo (6). De igual manera las otras especies de hongos comestibles son cultivadas y consumidas, principalmente, en el Este Asiático. Una excepción es el caso de Pleurotus ostreatus, cultivado y consumido cada vez más en Europa y los EE.UU con 169,000 toneladas anuales en 1986.

Aunque los hongos comestibles han sido consumidos como alimento básico en ciertas zonas de Europa, Africa y Sudamérica, generalmente se les considera más como un ingrediente o complemento de diferentes platillos. Una posible explicación puede ser la escasa oferta del producto, el precio comparativamente alto y su alta susceptibilidad al deterioro (26). La segunda causa está íntimamente ligada a la primera; en definitiva, una mayor oferta resultaría en un menor precio. Esto no obstante, requeriría de la instrumentación de nuevas formas y canales de comercialización que permitan la disponibilidad del producto a un mayor mercado. Independientemente de cómo y en qué medida sean resueltos estos problemas, la importancia de los hongos como fuente de alimento ha aumentado y aumentará debido a sus excelentes cualidades sensoriales: agradable sabor y fina textura.

En México Pleurotus ostreatus se identifica con el nombre de "seta", "hongo ostión", "oreja de izote", "oreja blanca", "oreja de palo" y "hongo de bagazo" (30). El cual es uno de los alimentos más antiguos consumidos por el hombre. La producción de setas es una de las pocas posibilidades existentes para la biotransformación de residuos lignocelulósicos sin someterlos a pretratamientos, antes mencionados (28).

#### 2.2.6 Características sensoriales.

Los esporoforos de Pleurotus ostreatus se caracterizan por su casquete cónico, al principio presenta una apariencia de campana, luego convexa y por último plana, con una pequeña protuberancia en el centro. Su diámetro cuando es adulto, es de 5 a 20 cm. Presenta varios matices del moreno al castaño, y a veces de blanquisco a color café muy claro (31).

Las lamelas son primero blancas y luego de color rosa o carne, son blandas y muy separadas del tallo. Este es de 5 a 15 cm de altura, macizo, suave o ligeramente escamoso, blanco, pero oscuro en su base. Una peculiaridad de este género es lo blando de las lamelas.

Su sabor es agradable, tornándose correoso en el pie que puede o no presentarse según las condiciones de cultivo; cuando se cultivan en camas, desarrollan pies centrales, mientras que en superficies verticales forman pies laterales o excéntricos (43).

### 2.2.7 Valor nutritivo.

Para determinar el valor nutritivo de un alimento se consideran, por regla general, varios parámetros: comúnmente su composición química proximal, contenido de vitaminas y composición de aminoácidos en su proteína. La composición química debe tomarse con reservas ya que ésta se ve afectada por diversos factores como son las diferentes variedades existentes, la composición de la materia prima, el método de preparación del sustrato, el método de cultivo, la etapa de cultivo en la que se cosecha el producto y las condiciones de almacenamiento (26).

Los hongos comestibles presentan generalmente un alto contenido de humedad, de 85 a 92%; valor similar al de la mayoría de los vegetales. Se pueden encontrar grandes variaciones en el contenido de humedad dentro de una misma especie, la cual se debe principalmente a las condiciones ambientales en que se desarrolla el cultivo (26).

**PROTEINAS.** Para la cuantificación de proteínas se determina comúnmente el nitrógeno total del producto; se considera que este elemento representa un cierto porcentaje de las proteínas. En los hongos comestibles la presencia de nitrógeno no proteico (quitina, quitosanos, ácidos nucleicos) afecta esta medición. El contenido promedio de proteína es de 2.5 a 4.0% (base húmeda). En general, el contenido de proteína de los hongos frescos los sitúa en una posición intermedia entre los vegetales y los productos de origen animal; éste es aproximadamente dos veces el contenido de

proteína de vegetales tales como espárragos, col, zanahoria, y doce veces el de frutas como naranjas o manzanas (45). El valor nutritivo de una proteína depende de su contenido en aminoácidos esenciales, es decir aquellos que el humano no puede sintetizar y deben ser suministrados con la dieta.

**CARBOHIDRATOS.** Diferentes carbohidratos han sido identificados en diferentes especies de *Pleurotus*, dentro de éstos se encuentran azúcares reductores, hemicelulosa, celulosa y grandes cantidades de manitol. Este último azúcar tiene un papel fisiológico importante en la asimilación y retención del agua (45).

**GRASAS.** El contenido promedio de grasas de *Pleurotus ostreatus* se encuentra entre 2.0-2.5%.

**MINERALES.** Un análisis de las cenizas muestra que *Pleurotus* contiene cantidades apreciables de potasio, fósforo, cobre y hierro, aunque bajos niveles de calcio por lo que es una fuente rica en algunos minerales para la alimentación humana (44).

**VITAMINAS.** *Pleurotus* contiene una buena cantidad de ciertas vitaminas, aunque las clasificadas como "liposolubles" (A, D, E y K) son escasas debido al bajo contenido de grasas. En lo que se refiere a vitaminas solubles en agua, por cada 100 g de producto seco se cuenta con 5 mg de riboflavina, 55 mg de niacina y 82 mg de ácido ascórbico (45).

#### 2.2.8 Efectos del almacenamiento sobre la calidad del producto.

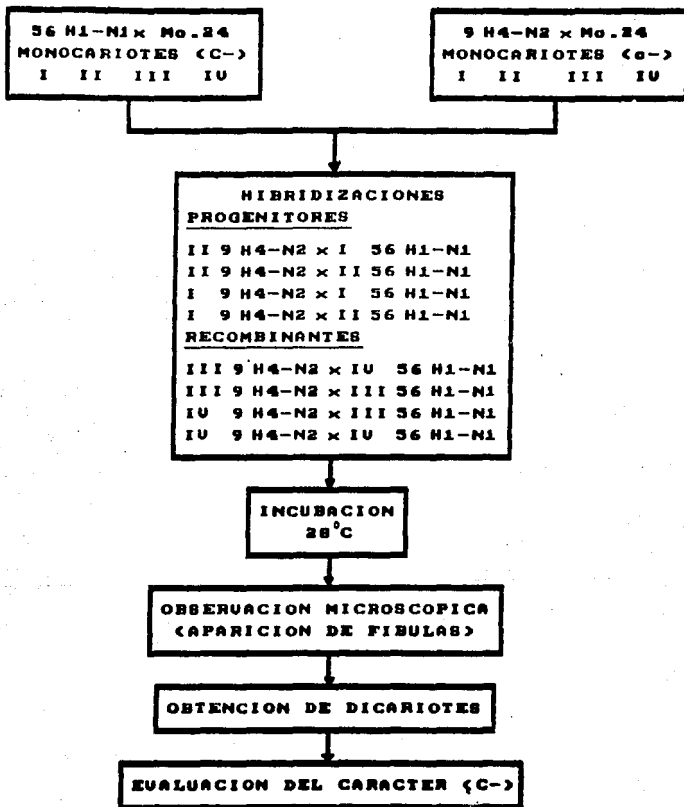
Después de la cosecha, los esporoforos de Pleurotus ostreatus continúan respirando a altas velocidades y sufren cambios en su morfología, apariencia y composición química. Estos cambios presentan considerable importancia para la comercialización y consumo. La frescura se pierde como consecuencia de la respiración, disminuyendo igualmente el peso seco. Este proceso es más evidente a temperatura ambiente. Simultáneamente se presenta una pérdida considerable de proteína, lo que afecta significativamente su valor nutritivo. Por lo anterior es recomendable que el producto cosechado sea enfriado o procesado lo más pronto posible después del corte, mediante secado, enlatado o cualquier otro método de preservación. De esta manera se evitan, también, los daños causados por los diversos microorganismos que trae normalmente consigo. De igual manera el oscurecimiento enzimático provocado por daños mecánicos sobre su superficie puede reducirse y debe evitarse un almacenamiento prolongado que también resulta en un oscurecimiento (26).

## **PARTE EXPERIMENTAL**

PARTE EXPERIMENTAL

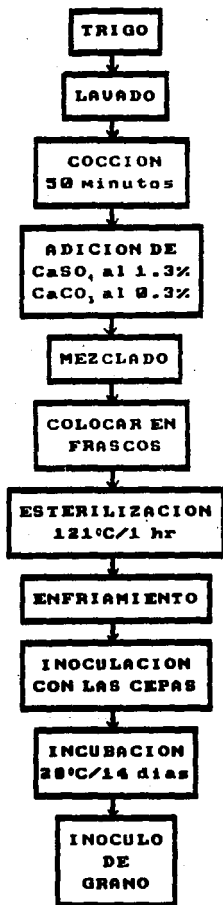
3.1 DIAGRAMA.

3.1.1 Diagrama para el mejoramiento genético.

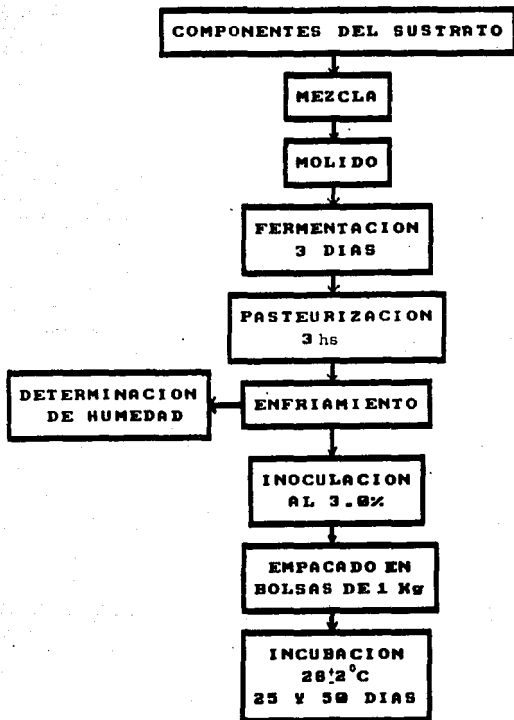




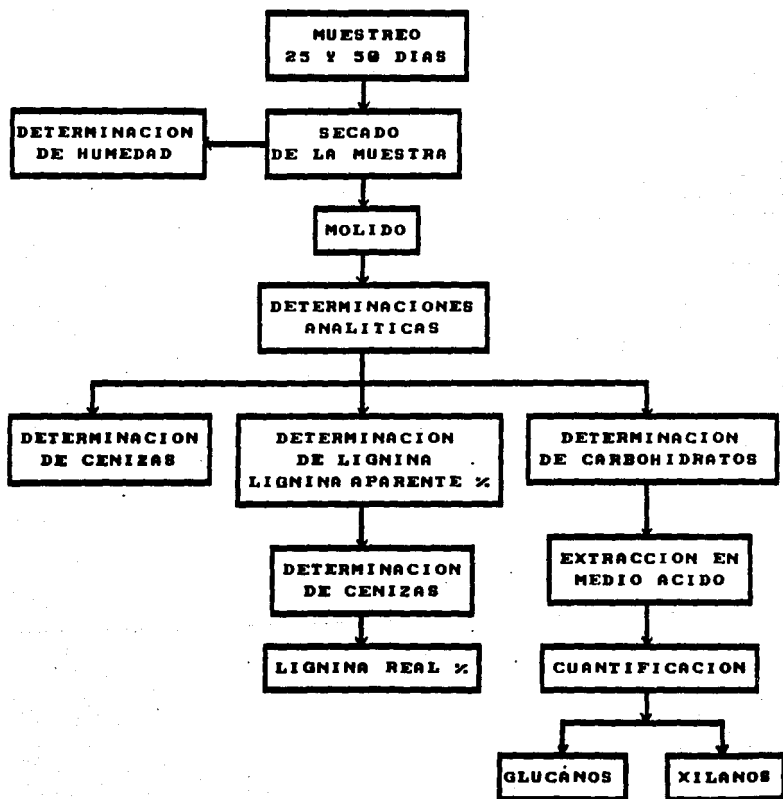
3.1.2 Diagrama de la preparación del inóculo de grano.



3.1.3 Diagrama de la preparación del sustrato para evaluar los patrones de consumo de los dicaríotes celulolíticos.



3.1.4 Diagrama de la evaluación de los patrones de consumo de los dicaríotes acelulolíticos sobre los componentes del sustrato.



### 3.2 MATERIAL Y EQUIPO.

Para mejor habilidad del contexto este inciso está ampliamente desarrollado en el Apéndice.

### 3.3 METODOLOGIA.

#### 3.3.1 MEJORAMIENTO GENETICO.

Para hibridizar los monocariotes, de cada uno de éstos cortar un cuadro de agar de 0.5 x 0.5 cm de lado, de la periferia de una colonia en crecimiento. Colocar estos cuadros de agar en una caja Petri con medio de extracto de malta lo más cercano posible (Por lo general se realizaron en una misma caja petri de 4 a 6 cruza). A continuación incubar las cajas petri a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 6 días para ser observadas microscópicamente con el ocular de 16 campos de amplificación. Determinar una cruza como positiva cuando al observarla al microscopio se aprecien fibulas o conexiones "clamps". Para evitar errores se considera que la cruza es positiva cuando estas estructuras son observadas por lo menos en tres diferentes puntos situados de manera equidistante en la periferia de la nueva colonia. Las conexiones "clamp" son estructuras que se forman únicamente cuando se lleva a cabo una fusión celular entre las cepas hibridizadas. Es por ello que su presencia implica que los dos monocariotes apareados son compatibles y por lo tanto dan origen a la formación de un dicariote.

### 3.3.1.1 Evaluación de los patrones de consumo de los dicaríotes acelulolíticos sobre el sustrato.

Los sustratos lignocelulósicos inoculados con las diferentes cepas se incuban a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , tomándose muestras a los 25 y 50 días. Secar las muestras para determinar su contenido de humedad y los cambios en su composición. Estos cambios son detectados cuantificando en el sustrato, a cada período de incubación las cantidades de cenizas, lignina, glucanos y xilanos.

### 3.3.2 DETERMINACIONES ANALITICAS.

#### Cenizas (4).

Para cuantificar las cenizas, colocar un crisol a peso constante en la mufla a  $550^\circ\text{C}$ . Una vez frío el crisol, pesar 1 g de la muestra y carbonizar con la ayuda de un mechero. A continuación colocar nuevamente el crisol en la mufla hasta obtener cenizas de color blanco o gris. Finalmente dejar enfriar el crisol dentro de un desecador y pesar nuevamente.

#### Lignina (15).

Esta determinación se basa en que al tratar un material lignocelulósico con un ácido fuerte se hidrolizan todos los carbohidratos y por lo tanto se solubilizan, dejando un residuo insoluble que por definición es la lignina.

Para determinar la lignina, pesar 1 g de muestra seca en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y adicionar 10 ml de ácido sulfúrico al 72%. Mezclar la muestra para que se humedezca con el ácido y dejar reposar durante una hora. A continuación adicionar 280 ml de agua destilada, tapan el matraz con hule espuma y papel aluminio y esterilizar a 121°C y 15 libras de presión durante una hora. Después del tratamiento térmico el contenido del matraz se filtra en caliente en papel Whatman No.1 previamente tarado. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado de lignina con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado alcance un valor cercano a 6. Posteriormente secar el papel filtro a 60°C hasta peso constante. El material residual corresponde a la lignina aparente. Para determinar la lignina real se requiere cuantificar la cantidad de cenizas insolubles que permanecen retenidas en la lignina aparente. Para ello tomar entre 0.2 y 0.4 g de lignina aparente y cuantificar las cenizas. La cantidad de lignina real se calcula de la siguiente manera:

$\text{lignina aparente (\%)} = \text{Peso de lignina} / \text{Peso de la muestra} \times 100$

$\text{lignina real (\%)} = \% \text{ lignina aparente} (1 - \% \text{ de cenizas en lignina})$

#### Extracción de carbohidratos (24 y 25).

Esta determinación se basa en que al tratar un material lignocelulósico con un ácido fuerte se solubilizan todos los carbohidratos, para ser cuantificados posteriormente por métodos específicos.

Para extraer los carbohidratos pesar 200 mg de muestra en un tubo de centrifuga de 15 ml de capacidad y adicionar con agitación 10 ml de ácido sulfúrico al 67%. Dejar la muestra reposar durante una hora a temperatura ambiente, agitando cada 15 minutos. A continuación centrifugar a 5 000 rpm durante 20 minutos y eliminar el precipitado obtenido. En la solución resultante determinar los glucanos y los xilanos.

#### Glucanos (24).

En el método de Klein-Weissman, las hexosas son oxidadas por el ácido sulfúrico y dan origen al formaldehído, el cual en presencia de ácido cromotrópico propicia una coloración violeta proporcional al contenido de hexosas. La eficiencia del método analítico seleccionado y de los factores que interfieren en el desarrollo del color fueron estudiados en un trabajo previo (1). Considerando los resultados obtenidos en dicho estudio, las condiciones óptimas para la cuantificación de hexosas son las siguientes:

- Tiempo de calentamiento: 50 minutos.
- Absorbancia máxima: 570 nm.
- Concentración de ácido cromotrópico: 0.5 g en 205 ml de ácido sulfúrico 15 M.

Con las condiciones óptimas realizar una curva estándar de glucosa en agua.

La cuantificación de glucanos se lleva a cabo de la siguiente manera: colocar 1 ml de la solución problema en un tubo de ensaye y añadir a continuación 5 ml del reactivo de Klein-Weissman. Tapar los tubos de ensaye y colocarlos en un baño de agua a temperatura de ebullición durante 50 minutos. A continuación enfriar los tubos inmediatamente y leer a 570 nm contra un blanco de agua.

Para preparar el reactivo de Klein-Weissman, disolver 0.5 g de ácido cromotrópico en 5 ml de agua destilada y adicionar 205 ml de ácido sulfúrico 15 M. El reactivo se debe preparar al momento, de lo contrario se requiere guardarlo en refrigeración por un máximo de dos semanas.

#### Xilanos (40).

El método de Tracey se fundamenta en que al oxidarse las pentosas por la acción del ácido acético en presencia de anilina y oxígeno se desarrolla un complejo colorido de color naranja. Esta coloración es proporcional a la cantidad de pentosas presentes en la muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos en un trabajo previo (1), las condiciones óptimas para la cuantificación de hemicelulosa son las siguientes:

- Absorbancia máxima: 475 nm.
- Temperatura de reacción:  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Tiempo de reacción: 24 horas.



Con estas condiciones realizar una curva estándar con soluciones de xilosa en ácido sulfúrico al 67%, debido a que la xilosa es el componente que se encuentra en mayor proporción en la hemicelulosa.

Para llevar a cabo esta determinación, colocar 2 ml de la muestra en un tubo de ensaye y adicionar 6 ml del reactivo de Tracey. Dejar los tubos de ensaye en la obscuridad a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. A continuación tomar las lecturas de las muestras a 475 nm contra un blanco de ácido sulfúrico al 67%. Preparar el reactivo de Tracey mezclando en un frasco de color ámbar 100 ml de ácido acético glacial, 5 ml de ácido oxálico al 5%, 24 ml de agua destilada y 16 ml de anilina incolora. El reactivo no debe usarse después de una semana de su preparación.

### 3.4 EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

En el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la UNAM, se han logrado avances en el desarrollo de cepas de Pleurotus ostreatus para la degradación selectiva de lignina. Al inicio del presente trabajo se contaba ya con mutantes acelulolíticos (C-), algunas de las cuales habían sido mejoradas genéticamente (34 y 35). Sin embargo, el desarrollo micelial de la mayoría de esas cepas (C-) era todavía muy pobre. Por ello, para este trabajo se planteó un mejoramiento genético por hibridaciones entre las mejores cepas (C-) con el objeto de obtener cepas donde se combinara el carácter acelulolítico con un vigoroso crecimiento micelial y una buena capacidad para consumir lignina. Al desarrollar cepas con estas características se lograría un avance significativo hacia una eficiente y selectiva degradación de la lignocelulosa.

Las cepas monocarióticas con carácter (C-) que en este trabajo fueron hibridadas pertenecían a dos diferentes progenies portadoras del carácter (C-), la del dicariote 56 H1-N1 x Mo.24 y la del dicariote 9 H4-N2 x Mo.36. Como se sabe este hongo presenta 4 tipos de compatibilidad, 2 corresponden a los tipos progenitores y los 2 restantes a los tipos recombinantes. Los monocariotes acelulolíticos de cada progenie se recibieron ya clasificados de acuerdo a su tipo de compatibilidad. En la Tabla 1 se presenta la clasificación de éstos de acuerdo a sus tipos de compatibilidad. De los 2 tipos progenitores, el tipo 1 siempre corresponde al tipo de compatibilidad de la cepa mutante

portadora del carácter (C-) ya sea el monocariote 56 H1-N1 o bien el 9 H4-N2. El tipo II corresponde entonces a los tipos de compatibilidad de los monocariotes silvestres, ya sea el Mo.24 o Mo.36.

#### 3.4.1 Apareamientos entre monocariotes compatibles con diferente capacidad para consumir celulosa.

En la Tabla 2 se indican los apareamientos realizados con las cepas monocarióticas acelulolíticas de las 2 progenies portadoras del carácter (C-). Los resultados muestran que de un total de 88 apareamientos, 70 fueron positivos es decir formaron dicariotes y 18 fueron negativos.

#### 3.4.2 Selección de dicariotes acelulolíticos.

##### 3.4.2.1 Medio de sales minerales-carboximetilcelulosa (SM-CMC).

Una vez obtenidos los 70 dicariotes se procedió a determinar su capacidad para consumir celulosa. Para ello, se llevó a cabo una evaluación del carácter acelulolítico/celulolítico en medio SM-CMC a los 7 y 14 días de incubación. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 3. Durante los primeros 7 días de incubación, 21 dicariotes fueron clasificados como celulolíticos (C+) y 49 dicariotes como acelulolíticos (C-). En la segunda evaluación, a los 14 días de incubación, se observó que un número mayor de cepas fueron capaces de formar halo celulolítico, resultando 64 dicariotes como (C+) y únicamente 6 como tipo (C-).

#### 3.4.2.2 Medio de extracto de malta deproteinado-carboximetil celulosa (DPMA-CHC).

En el medio SM-CHC se observó que el crecimiento micelar era generalmente muy pobre, por ello se decidió cambiar la primera capa del medio de sales minerales por extracto de malta de proteinado, ya que este medio es más rico en nutrientes. Era de esperarse que al emplear un medio con mayor disponibilidad de nutrientes sería posible realizar esta evaluación de forma más rigurosa, es decir en este caso se eliminarían a las cepas de tipo celulolíticas que no manifestaran su carácter por falta de nutrientes. La mayor disponibilidad de nutrientes resultaría en un más rápido y abundante crecimiento micelar, además se disminuirían los riesgos de contaminación en los medios de prueba y se lograría eventualmente una más rápida detección del carácter (C-).

El tiempo de evaluación en este caso fue de 7, 14 y 21 días. Se seleccionaron estos tiempos de muestreo para determinar si el comportamiento de las cepas variaba al aumentar el tiempo de incubación y al mismo tiempo definir cuando es posible determinar por primera vez el carácter (C-).

Al mismo tiempo que se evaluaron los 6 dicariones en éste nuevo medio, también se evaluaron 4 cepas testigo, que de antemano se sabía eran de tipo celulolítico.

Durante los primeros 7 días todos los dicariones (C-) no presentaron formación del halo, mientras que todas las cepas

testigo si desarrollaron la formación del halo (Tabla 4). A los 14 días se observó una formación del halo muy difusa con 3 cepas, mientras que las otras 3 no lo habían desarrollado (1:48 x 489, 1:71 x 489 y 2:54 x 489). A los 21 días de incubación estos 3 últimos dicaríotes permanecieron sin formar halo. Este comportamiento no varió aún después de prolongar el tiempo de incubación hasta 31 días.

De esta manera, en el experimento anterior al hibridizar las progenies de los 2 dicaríotes 56 H1-N1 x Mo.24 y 9 H4-N2 x Mo.36, fue posible obtener 3 cepas acelulolíticas de un total de 70 apareamientos. Resultaba entonces necesario evaluar el comportamiento de estas cepas sobre la lignocelulosa para determinar las posibilidades de su uso práctico. Para este objetivo era conveniente propagarlas sobre un desperdicio lignocelulósico y determinar los patrones de consumo de la lignocelulosa por los 3 dicaríotes (C-). También se podría seleccionar simultáneamente a las cepas más prometedoras al observar su agresividad sobre el desperdicio lignocelulósico utilizado.

### 3.4.3 EVALUACION DE LOS PATRONES DE CONSUMO DE LA LIGNOCELULOSA POR LOS DICARÍOTES ACELULOLITICOS.

Para llevar a cabo esta evaluación se utilizó un sustrato formulado con paja de trigo, rastrojo de maíz y olote. Este fue inoculado con las 3 cepas acelulolíticas obtenidas en el mejoramiento genético. Para este experimento se emplearon también

4 cepas testigo y 5 cepas acelulolíticas provenientes de otra investigación, las cuales no habían sido evaluadas previamente sobre un material lignocelulósico.

El desarrollo micelial de los 8 dicaríotes (C-) y las 4 cepas testigo fue evaluado de manera visual a los 25 y 50 días de incubación como se muestra en la Tabla 5. A los 25 y 50 días las cepas controles B x 3, 56 Hi-Ni x Mo, 24, 56 Hi-Ni x Mo, 38 y 56 Hi-Ni x 9 H4-N2 y las cepas 1:48 x 489, 1:71 x 489 y 2:54 x 489 mostraron un desarrollo vegetativo abundante, es decir todo el sustrato fue invadido por el micelio. A los 25 días las cepas 71 x 48 y 88 x 92 presentaron un desarrollo micelial todavía pobre, mientras que el desarrollo vegetativo de la cepa 16 x 65 fue nulo. A los 50 días las cepas 71 x 48 y 88 x 92 presentaron un incremento en el desarrollo vegetativo, mientras que la cepa 16 x 65 presentó hasta entonces un pobre desarrollo micelial.

La composición del sustrato se analizó en términos de cenizas, lignina y carbohidratos por medio de una hidrólisis total con ácido sulfúrico al 67% y subsecuente determinación de glucanos y xilanos.

En la cuantificación de glucanos y xilanos fue necesario realizar una curva estandar de glucosa en agua y xilosa en ácido sulfúrico respectivamente, ambas siguieron la ley de Lambert-Beer. La primera hasta una concentración de 40 mg/ml que correspondió a una absorbancia de 1.39 (Tabla 6) y la segunda presentó un rango de concentraciones de 0 a 50 µg/ml (Tabla 7).

Cada determinación se realizó por triplicado para las dos replicas de cada cepa a cada tiempo de incubación. Además se analizó el sustrato original sin inocular.

El sustrato pasteurizado sin inocular (al tiempo 0) presentó en base seca un contenido porcentual de ceniza del  $7.54 \pm 0.14$ , de lignina  $9.35 \pm 0.64$ , de glucanos  $64.24 \pm 0.18$  y de xilanos  $18.51 \pm 0.41$ .

En las Tablas 8 y 9 se reporta la composición del sustrato en base seca al tiempo 0 y después de 25 y 50 días de incubación con los 8 dicaríotes (C-) y las 4 cepas testigo. A los 25 días de incubación se puede observar que la proporción de lignina en las cepas 9 x 3, 1:71 x 489, 16 x 65, 18 x 37 y 71 x 48 disminuyó ligeramente de 9.35% a 9.00% aproximadamente; mientras que en las demás cepas se observó una disminución mayor, es decir se obtuvo un 7.08% para la cepa control 58 H1-N1 x Mo.24.

Con respecto a los glucanos se puede observar que todas las cepas presentaron una disminución en la proporción de este componente. La cepa 18 x 37 presentó una cantidad de glucanos de 60.84% semejante al sustrato sin inocular, seguida por las cepas controles 58 H1-N1 x 9 H4-N2 y 9 x 3 con 58.96% y 58.86% respectivamente. Con las cepas 16 x 65 y 1:48 x 489 y el control 58 H1-N1 x Mo.36 se presentó una mayor disminución en el porcentaje de glucanos, su cantidad bajo (52.96%, 52.64 y 52.50% respectivamente).

Para la cantidad residual de xilanos se pueden observar que las cepas con menor disminución en este componente fueron los controles 56 H1-N1 x Mo.36 y 56 H1-N1 x 9 H4-N2 ambos con 18.42%, mientras que las cepas que presentaron mayor disminución fueron los controles 56 H1-N1 x Mo.24 (15.25%) y 0 x 3 (15.62%) seguidos por las cepas 59 x 40 y 18 x 37 (18.25 y 16.59% respectivamente).

A los 50 días de incubación las cepas que presentaron menor cantidad de lignina fueron la 16 x 85, 1:49 x 489, 1:71 x 489 y la 2:54 x 489 (4.56%, 5.43%, 5.52% y 5.99% respectivamente). La menor proporsión de lignina fue para los controles 56 H1-N1 x Mo.24 y 0 x 3 seguidos por la cepa 56 H1-N1 x Mo.36 con cantidades residuales de 6.10, 6.20 y 6.49% respectivamente. Las cepas que presentaron una mayor cantidad de lignina a este tiempo de incubación fueron el control 56 H1-N1 x 9 H4-N2 (9.30%) y las cepas 71 x 48 y 18 x 37 (8.06% y 7.56% respectivamente).

Con respecto a la cantidad de glucanos, se puede observar que todas las cepas presentaron una disminución relativamente similar en este componente. Con las cepas 59 x 40, 86 x 82, 18 x 37 y la 1:71 x 489 se observaron las mayores cantidades residuales 85.87%, 85.68%, 85.00% y 84.14% respectivamente. La cepa que presentó la menor cantidad de glucanos fue la 71 x 48 con un 59.16%.

En relación con el contenido de xilanos se puede observar que la cepa 2:54 x 489 incrementó la proporción de este polisacárido en el sustrato de 25 a 50 días de 17.82% hasta 20.98%, mientras que las demás cepas mostraron una disminución.



En las Tablas 8 y 9 se observa que cuando los resultados se expresan en porcentajes de cada componente, la proporción de cenizas aumenta conforme el sustrato es degradado debido al desarrollo vegetativo. Este comportamiento resulta del hecho de que al ser consumidos los otros componentes del sustrato la proporción de cenizas se ve incrementada. Por ello no es posible determinar el consumo de cada componente del sustrato considerando únicamente sus datos de composición a los diferentes tiempos de incubación. Esto se logra calculando los porcentajes de pérdida de cada componente en base constante, es decir con respecto al contenido de cenizas, ya que éstas son el único componente del sustrato cuya cantidad neta no varía debido al desarrollo vegetativo de las cepas. Las cenizas al ser metabolizadas por el microorganismo son eventualmente incorporadas al micelio, pero en ningún momento se presentan pérdidas o ganancias del sistema por lo que su cantidad permanecen constante. En el Apéndice II se detalla la forma en que fueron calculados estos valores.

En las Tablas 10 y 11 se presenta la proporción en que fueron consumidos los componentes del sustrato a los 25 y 50 días de incubación por las diferentes cepas. En términos generales se puede observar que el consumo de los componentes del sustrato se incrementó en función del tiempo. Los porcentajes de pérdida de cada componente en los dos tiempos de muestreo se evaluaron por medio de una Prueba "T" y la Prueba de Duncan se utilizó para clasificar a las cepas de acuerdo al nivel de consumo de cada

componente (Comparación múltiple de medias) (Tablas 12, 13 y 14). El análisis estadístico se realizó con la ayuda del paquete estadístico S:P:S:S (Statistical Package for the Social Sciences) en la computadora Burroughs 7800.

En términos generales se puede observar que al comparar el consumo de los componentes del sustrato éste se incrementa en función del tiempo.

A los 25 días de incubación, la lignina fue degradada entre 17 y 54%. Las cepas 56 HI-NI x Mo.24 y 59 x 40 consumieron la mayor cantidad de lignina 54.03% a 45.96%, seguidos por los controles 56 HI-NI x 9 HA-N2 (37.63%) y 56 HI-NI x Mo.36 (35.75%) y la cepa 18 x 37 (35.59%). Las cepas 1:46 x 489 y 1:71 x 489 consumieron la menor cantidad de lignina 17.74 y 20.43% respectivamente. A los 50 días de incubación el nivel de consumo fue de 35% a 69% aproximadamente. El mayor consumo correspondió a las cepas 16 x 65 (69.35%), 1:71 x 489 (63.13%) y 59 x 40 (65.32%), seguidos por los controles 8 x 3 (60.21%) y 56 HI-NI x Mo.36 (56.18%). Estos resultados indican que al segundo tiempo, las tres primeras cepas consumieron cantidades mayores que las cepas control.

Al comparar la degradación de lignina a los 25 y 50 días de incubación se observó un mayor consumo al segundo tiempo de incubación (diferencia altamente significativa).

Con respecto al consumo de glucanos se observa a los 25 días de incubación que las cepas 59 x 40 (51.41%) presenta el mayor consumo seguida por la cepa control 56 HI-NI x Mo.24

(49.27%). Las cepas 86 x 92 y 1:48 x 489 presentaron el menor consumo de este componente (15.30 y 23.49% respectivamente). A los 50 días, el mayor consumo correspondió a la cepa 59 x 40 (44.67%) y el control 8 x 3 (43.71%) seguido por las cepas 1:71 x 489 (43.28%) y en menor medida los controles 56 Hi-Ni-Ni x Mo.36 (39.81%) y 56 Hi-Ni x Mo.24 (38.75%); las cepas 86 x 92 y 1:48 x 489 presentaron el menor consumo de este componente (18.91 y 23.00% respectivamente). Estos resultados muestran que todos los dicaríotes (C-) al compararlos con la cepa silvestre 8 x 3 presentan alterada su capacidad de metabolizar glucanos, con excepción de las cepas 59 x 40 y 1:71 x 489.

Con respecto al consumo de xilanos a los 25 días de incubación se observa que la cepa 56 Hi-Ni x Mo.24 (50.20%) consumió una cantidad semejante a la cepa 59 x 40 (49.63%) seguido por la cepa control 8 x 3 (40.19%) y la cepa 18 x 37 (37.05%). A los 50 días de incubación se observó que todas las cepas presentaron un drástico incremento en el consumo de este componente de un 8 a 50% para los 25 días y de 28 a 82% para los 50 días de incubación.

Finalmente se analizó el consumo de carbohidratos con respecto al consumo de lignina durante la incubación. En la Tabla 15 se presentan los resultados del consumo de glucanos y carbohidratos totales con respecto al de lignina. A los 25 días de incubación, se puede observar que la cepa control 8 x 3 consume más glucanos que lignina. Los controles 56 Hi-Ni x Mo.24, 56i-Ni x Mo.36 y 56 Hi-Ni x O H4-N2 por el contrario consumieron

menos glucanos. Con respecto a los dicariotes (C-) todos consumieron mayor cantidad de glucanos que de lignina, a excepción de la cepa 86 x 92 que consumió menor cantidad de glucanos. Sin embargo a los 50 días de incubación todas las cepas consumieron menor cantidad de glucanos por gramo de lignina metabolizada. La única excepción la presenta la cepa control 56 H1-N1 x 9 H4-N2.

Cuando esta comparación se realiza considerando los carbohidratos totales se observa un comportamiento similar al anterior. Es decir a los 25 días la mayoría de las cepas consumen mayor cantidad de carbohidratos por gramo de lignina consumida y a los 50 días este comportamiento se invierte.

**TABLA 1. MONOCARIOTES PROGENIE DE LOS DICARIOTES  
56 H1-N1 x Mo. 24 y 9 H4-N2 x Mo. 36 UTILI-  
ZADOS PARA LA OBTENCION DE DICARIOTES  
POR HIBRIDIZACION.**

DICARIOTE PROGENITOR	CLAVE	MONOCARIOTES ACELULOLITICOS			
		CLASIFICACION DE ACUERDO AL TIPO DE COMPATIBILIDAD			
		TIPOS PROGENITORES		TIPOS RECOMBINANTES	
		I	II	III	IV
56 H1-N1 x No. 24	0 56)	1:68	1:33	1:74	1:84
		1:71	1:48	1:86	1:92
		2:45	2:72	2:92	2:18
		2:54			2:19
		2:62			2:55
9 H4-N2 x No. 36	0 9)	483	138	517	216
		489			239
		505			620
		512			

**TABLA 2: APAREAMIENTOS ENTRE MONOCARIOTES ACELULOLITICOS DE LAS PROGENIES 56 H1-N1 x Mo. 24 y 9 H4-N2 x Mo. 36.**

<b>TIPOS DE MONOCARIOTES APAREADOS</b>	<b>TOTAL DE APAREAMIENTOS</b>	<b>APAREAMIENTOS POSITIVOS</b>
<b><u>PROGENITORES</u></b>		
II D9 x I D56	15	15
II D9 x II D56	9	9
I D9 x I D56	20	20
I D9 x II D56	12	12
<b><u>RECOMBINANTES</u></b>		
III D9 x IV D56	5	5
III D9 x III D56	3	0
IV D9 x III D56	9	9
IV D9 x IV D56	15	0

**TABLA 3** : EVALUACION DEL CARACTER ACELULOLITICO SOBRE MEDIO SM-CMC DE LOS APAREAMIENTOS ENTRE LOS MONOCARIOTES DE LAS PROGENIES 56 H1-N1 x Mo. 24 Y 9 H4-N2 x Mo. 36.

APAREAMIENTOS ENTRE TIPOS PROGENITORES		APAREAMIENTOS ENTRE TIPOS RECOMBINANTES	
TIEMPO DE INCUBACION*			
7/14*		7/14*	
<p>A) 138 x</p> <p>511 x</p> <p>519 x</p>	<p>B) 483 x</p> <p>489 x</p> <p>585 x</p> <p>512 x</p>	<p>C) 483 x</p> <p>489 x</p> <p>585 x</p> <p>512 x</p> <p>D) 138 x</p> <p>511 x</p> <p>519 x</p>	<p>E) 216 x</p> <p>239 x</p> <p>628 x</p> <p>F) 517 x</p>
<p><b>TIPOS PROGENITORES:</b></p> <p>56 H1-N1 x Mo. 24</p> <p>9 H4-N2 x Mo. 36</p>		<p><b>TIPOS RECOMBINANTES:</b></p> <p>56 H1-N1 x Mo. 24</p> <p>9 H4-N2 x Mo. 36</p>	
<p>*TIEMPO DE INCUBACION: 7 días / 14 días de propagación vegetativa.</p>			

**TABLA 4 : EVALUACION DE CARACTER ACELULOLITICO (C-) POR MEDIO DE LA FORMACION DE HALO CELULOLITICO SOBRE MEDIO DPMA-CMC.**

CEPAS	TIEMPO DE INCUBACION (días)			
	7	14	21	31
<b><u>CONTROLES</u></b>				
B x 3	C+	C+	C+	C+
56 H1-N1 x Mo. 24	C+	C+	C+	C+
56 H1-N1 x Mo. 36	C+	C+	C+	C+
56 H1-N1 x 9 H4-N2	C+	C+	C+	C+
<b><u>DICARIDOTES (C-)</u></b>				
1:48 x 489	C-	C-	C-	C-
1:71 x 489	C-	C-	C-	C-
2:54 x 489	C-	C-	C-	C-
1:74 x 239	C-	C!	C+	C+
1:86 x 239	C-	C!	C+	C+
1:74 x 628	C-	C!	C+	C+
C- AUSENCIA DE HALO CELULOLITICO C+ FORMACION DE HALO CELULOLITICO C! FORMACION DE HALO CELULOLITICO DIFUSO				



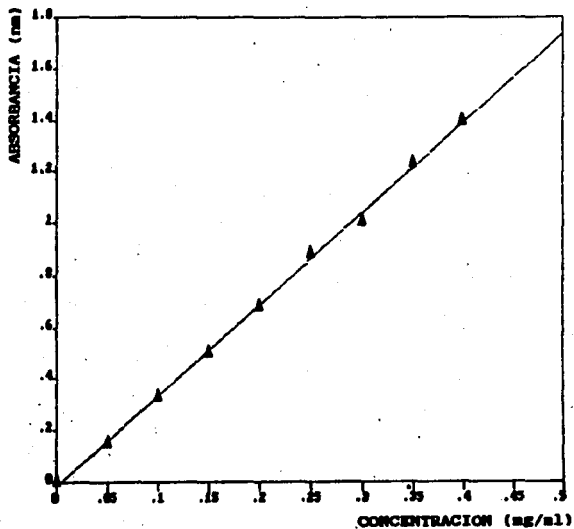
**TABLA 5 : DESARROLLO MICELIAR DE DICARIOTES (C-) SOBRE UN SUSTRATO DE PAJA DE TRIGO-RASTROJO DE MAIZ- OLOTE A LOS 25 Y 50 DIAS DE INCUBACION.**

CEPAS	DESARROLLO MICELIAR*	
	TIEMPO DE INCUBACION (dias)	
	25	50
<b><u>CONTROLES</u></b>		
0 x 3	3	3
56 H1-N1 x Mo. 24	3	3
56 H1-N1 x Mo. 36	3	3
56 H1-N1 x 9 H4-N2	3	3
<b><u>DICARIOTES (C-)</u></b>		
1:48 x 489	3	3
1:71 x 489	3	3
2:54 x 489	3	3
16 x 65	0	1
18 x 37	3	3
59 x 48	3	3
71 x 48	1	2
86 x 92	1	2
<p>* CRECIMIENTO MICELIAR: se evalua de manera visual de acuerdo a la siguiente escala:</p> <p>0 = NULO  1 = POBRE  2 = BUENO  3 = ABUNDANTE</p>		

**TABLA 6 : CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE GLUCANOS  
POR EL METODO MODIFICADO DE KLEIN WEISSMAN.**

<b>CONCENTRACION DE GLUCOSA (mg/ml)</b>	<b>ABSORBANCIA (<math>\lambda = 570 \text{ nm}</math>)</b>
0.00	0.00
0.05	0.15
0.10	0.33
0.15	0.50
0.20	0.68
0.25	0.88
0.30	1.00
0.35	1.23
0.40	1.39

## CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE GLUCANOS



**COEFICIENTE DE CORRELACION = 0.9993**

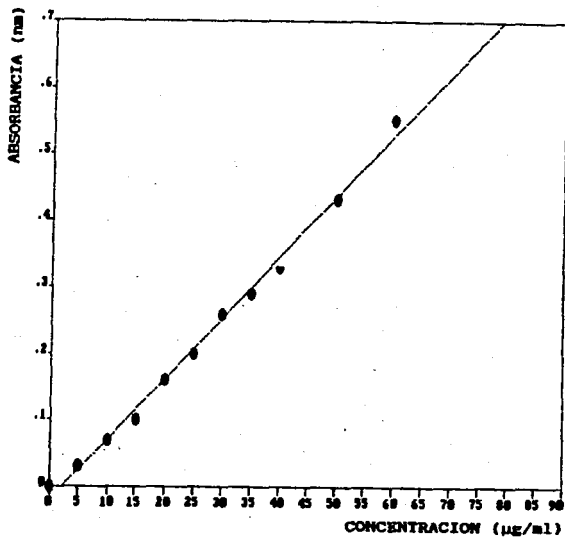
**INTERCEPTO = -0.017**

**PENDIENTE = 3.50**

**TABLA 7 : CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE XILANOS  
UTILIZANDO COMO REFERENCIA UNA SOLUCION DE XILOSA  
EN ACIDO SULFURICO AL 67% (METODO DE TRACEY).**

<b>CONCENTRACION DE XILOSA</b> (µg/ml)	<b>ABSORBANCIA</b> (λ = 475 nm)
0	0.00
5	0.03
10	0.07
15	0.10
20	0.16
25	0.20
30	0.26
35	0.29
40	0.33
50	0.43
60	0.55
80	0.58

## CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE XILANOS



**COEFICIENTE DE CORRELACION = 0.9873**

**INTERCEPTO = 0.00051**

**PENDIENTE = 0.0088**

**TABLA 8 : COMPOSICION DEL SUSTRATO DE PAJA DE TRIGO-  
RASTROJO DE MAIZ-OLOTE A LOS 25 DIAS DE  
INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.**

C E P A S	COMPOSICION (g/100g de sustrato seco)			
	CENIZAS	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
			GLUCANOS	XILANOS
<b>SUSTRATO (TIEMPO 0)</b>	7.54'0.14	9.35'0.65	64.44'0.33	18.51'0.41
<b><u>CONTROLES</u></b>				
8 x 3	10.81'0.66	9.00'0.26	58.86'0.76	15.62'0.59
56 NI-NI x No.24	12.35'0.96	7.06'0.29	53.27'1.15	15.25'0.93
56 NI-NI x No.36	8.99'0.31	7.17'0.38	52.50'1.15	18.42'0.31
56 NI-NI x 9 N4-N2	9.36'0.16	7.28'0.15	58.96'0.74	18.42'0.31
<b><u>DICARIOTES (C-)</u></b>				
1:00 x 009	8.10'0.29	8.26'1.32	52.64'0.63	17.48'0.39
1:71 x 009	9.66'0.21	9.23'1.35	53.28'0.71	18.92'0.26
2:54 x 009	9.76'0.23	8.47'0.19	54.80'0.27	17.82'0.68
16 x 65	9.44'0.65	9.01'0.56	52.96'0.98	17.34'0.32
18 x 37	10.90'0.92	9.34'0.54	60.84'0.74	16.59'0.61
59 x 00	12.99'0.78	8.71'0.35	53.81'0.81	16.25'0.31
71 x 48	9.76'0.39	9.16'0.18	53.31'0.63	17.34'0.70
86 x 92	7.70'0.28	7.61'0.33	55.58'0.76	17.23'0.36

**TABLA 9 : COMPOSICION DEL SUSTRATO DE PAJA DE TRIGO-  
RASTROJO DE MAIZ-OLOTE A LOS 50 DIAS DE  
INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.**

C E P A S	COMPOSICION (g/100g de sustrato seco)			
	CENIZAS	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
			GLUCANOS	XILANOS
<b>(SUSTRATO)</b>	7.54'0.14	6.29'1.09	64.44'0.33	18.51'0.41
<b>CONTROLES</b>				
0 x 0	12.70'0.96	6.10'0.66	61.00'0.39	15.49'0.92
56 NI-NI x No.24	12.07'0.33	6.49'0.32	62.17'1.67	15.66'0.46
56 NI-NI x No.26	11.05'0.30	9.30'0.22	61.46'0.00	11.10'0.70
56 NI-NI x 9 NI-NI	10.18'0.36	9.30'0.22	61.00'1.25	15.72'0.17
<b>DICARIOTES (C-)</b>				
1:00 x 009	9.23'0.49	5.43'0.31	60.71'0.52	15.00'0.62
1:71 x 009	13.29'0.37	5.52'0.31	64.14'0.21	14.07'0.45
2:54 x 009	10.20'0.33	5.99'0.19	60.97'0.60	20.98'0.55
16 x 63	11.94'0.36	4.56'0.35	63.23'0.45	11.05'0.46
18 x 37	12.06'0.90	7.56'0.25	65.00'0.42	13.06'0.37
39 x 00	14.07'0.30	6.00'0.15	65.07'0.42	15.60'0.09
71 x 00	10.04'0.74	0.06'0.14	59.16'0.10	12.03'0.70
06 x 02	0.03'0.29	6.53'0.65	65.60'0.64	16.96'0.39

**TABLA 10: PERDIDA DE LIGNINA Y CARBOHIDRATOS DEL  
SUSTRATO DE PAJA DE TRIGO-RASTROJO DE  
MAIZ-OLOTE A LOS 25 DIAS DE INCUBACION  
CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.**

CEPAS	PERDIDA (%)		
	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
		GLUCANOS	XILANOS
<b><u>CONTROLES</u></b>			
8 x 3	28.23'1.23	36.10'0.82	40.10'1.46
56 H1-N1 x Mo.24	54.83'1.61	49.27'0.94	58.28'1.11
56 H1-N1 x Mo.36	35.75'0.46	31.45'0.83	16.00'1.38
56 H1-N1 x 9 H4-N8	37.63'1.23	41.36'0.24	19.73'1.43
<b><u>DICARIOTES (C-)</u></b>			
1:48 x 489	17.74'0.81	23.49'0.85	12.28'2.87
1:71 x 489	28.43'1.14	47.44'0.83	28.73'1.23
2:54 x 489	38.48'1.71	44.67'1.67	12.48'0.36
16 x 65	28.72'1.24	34.28'1.23	24.65'0.99
18 x 37	33.59'0.97	34.48'0.79	37.85'1.11
59 x 48	43.96'1.13	51.41'0.88	49.63'1.88
71 x 48	24.19'0.88	36.88'0.79	23.38'1.82
86 x 92	23.92'1.14	13.38'0.58	8.82'2.86



**TABLA 11: PERDIDA DE LIGNINA Y CARBOHIDRATOS DEL SUSTRATO DE PAJA DE TRIGO-RASTROJO DE MAIZ-OLOTE A LOS 50 DIAS DE INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.**

C E P A S	PERDIDA (%)		
	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
		GLUCANOS	XILANOS
<b><u>CONTROLES</u></b>			
8 x 3	60.21' 0.47	43.71' 0.71	40.72' 1.72
56 H1-N1 x Mo. 24	54.04' 1.61	38.75' 0.67	47.76' 1.45
56 H1-N1 x Mo. 36	56.10' 1.02	39.01' 0.56	62.92' 0.43
56 H1-N1 x 9 H4-N2	36.02' 0.81	28.71' 0.69	36.90' 0.54
<b><u>DICARIOTES (C-)</u></b>			
1.48 x 489	52.41' 2.90	23.00' 0.47	34.76' 1.79
1.71 x 489	63.13' 1.34	43.20' 0.20	54.57' 1.45
2.54 x 489	53.22' 1.39	30.54' 0.03	20.21' 0.07
16 x 65	69.35' 1.42	37.93' 0.36	59.39' 1.73
10 x 37	49.46' 1.67	36.00' 0.41	53.06' 1.25
59 x 40	65.32' 0.00	44.67' 0.36	54.06' 1.57
71 x 40	36.02' 1.23	30.76' 0.20	51.32' 1.17
06 x 92	35.01' 0.99	18.91' 0.01	47.09' 0.50

**TABLA 12: ANALISIS ESTADISTICO DEL CONSUMO DE LIGNINA POR LOS 8 DICARIOTES ACELULOLITICOS Y LAS 4 CEPAS CONTROL.**

<b>PRUEBAS ESTADISTICAS</b>	<b>RESULTADOS</b>	
<b>ANALISIS DE VARIANZA</b>	<b>DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P = 99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACION.</b>	
<b>PRUEBA DE DUNCAN</b>	<b>TIEMPO 1</b>	<b>TIEMPO 2</b>
	1:00 x 009    a 1:71 x 009    a 16 x 65        ab 06 x 92        bc 71 x 40        c 0 x 3            d 2:54 x 009    d 10 x 37        e 56 H1-N1 x No.36    e 56 H1-N1 x 9 H4-N2    e 59 x 40        f 56 H1-N1 x No.24    g	06 x 92        a 71 x 40        a 56 H1-N1 x 9 H4-N2    a 10 x 37        b 1:00 x 009    bc 2:54 x 009    bc 56 H1-N1 x No.24    c 56 H1-N1 x No.36    cd 0 x 3            d 59 x 40        e 1:71 x 009    e 16 x 65        e
<b>PRUEBA "T"</b>	0 x 3            Mayor (P=99%) 56 H1-N1 x No. 24    Mayor (P=99%) 56 H1-N1 x No. 36    Mayor (P=99%) 56 H1-N1 x 9 H4-N2    Mayor (P=99%) 1:48 x 489        Mayor (P=99%) 1:71 x 409        Mayor (P=99%) 2:54 x 489        Mayor (P=99%) 16 x 65            Mayor (P=99%) 10 x 37            Mayor (P=99%) 59 x 40            Mayor (P=99%) 71 x 40            Mayor (P=99%) 06 x 92            Mayor (P=99%)	
<b>ANALISIS DE VARIANZA: ESTE ANALISIS INDICO QUE EXISTIA UNA DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE LOS SUSTRATOS DEBIDO AL DESARROLLO MICELIAL DE LAS DIFERENTES CEPAS.</b>		
<b>PRUEBA DE DUNCAN: LAS LETRAS DIFERENTES PARA UN MISMO TIEMPO IMPLICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS CEPAS (P=99%). LAS CEPAS SE ORDENAN DE MENOR A MAYOR PERDIDA CONSIDERANDO SU MEDIA (D).</b>		
<b>PRUEBA "T": ESTA PRUEBA SE UTILIZO PARA COMPARAR EL SUSTRATO EN LA FORMACION DE LIGNINA ENTRE LOS 25 Y 50 DIAS DE INCUBACION PARA CADA CEPAS.</b>		

**TABLA 19: ANALISIS ESTADISTICO DEL CONSUMO DE GLUCANOS POR LOS 8 DICARIOTES ACELULOLITICOS Y LAS 4 CEPAS CONTROL.**

PRUEBAS ESTADISTICAS	RESULTADOS	
ANALISIS DE UARIANZA	DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACION.	
PRUEBA DE DUNCAN	<p style="text-align: center;"><u>TIEMPO 1</u></p> <p>86 x 92 a</p> <p>1:48 x 489 b</p> <p>56 H1-N1 x 9 H4-N2 c</p> <p>56 H1-N2 x No.36 d</p> <p>2:54 x 489 e</p> <p>16 x 65 e</p> <p>18 x 37 e</p> <p>1:71 x 489 ef</p> <p>71 x 48 f</p> <p>8 x 3 f</p> <p>56 H1-N1 x No.24 g</p> <p>59 x 48 h</p>	<p style="text-align: center;"><u>TIEMPO 2</u></p> <p>86 x 92 a</p> <p>1:48 x 489 b</p> <p>56 H1-N1 x 9 H4-N2 c</p> <p>2:54 x 489 d</p> <p>71 x 48 d</p> <p>18 x 37 e</p> <p>16 x 65 ef</p> <p>56 H1-N1 x No.24 fg</p> <p>56 H1-N2 x No.36 g</p> <p>1:71 x 489 h</p> <p>8 x 3 hi</p> <p>59 x 48 i</p>
	PRUEBA "T"	<p>8 x 3 Mayor (P=99%)</p> <p>56 H1-N1 x No. 24 Menor (P=99%)</p> <p>56 H1-N1 x No. 36 Mayor (P=99%)</p> <p>56 H1-N1 x 9 H4-N1 Igual</p> <p>1:48 x 489 Igual</p> <p>1:71 x 489 Mayor (P=99%)</p> <p>2:54 x 489 Mayor (P=99%)</p> <p>16 x 65 Mayor (P=99%)</p> <p>18 x 37 Mayor (P=99%)</p> <p>59 x 48 Menor (P=99%)</p> <p>71 x 48 Menor (P=99%)</p> <p>86 x 92 Mayor (P=99%)</p>
<p><b>ANALISIS DE UARIANZA:</b> ESTE ANALISIS INDICO QUE EXISTIA UNA DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE LOS SUSTRATOS DEBIDO AL DESARROLLO MICELIAR DE LAS DIFERENTES CEPAS.</p> <p><b>PRUEBA DE DUNCAN:</b> LAS LETRAS DIFERENTES PARA UN MISMO TIEMPO IMPLICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS CEPAS (P=99%). LAS CEPAS SE ORDENARON DE MENOR A MAYOR PUNTO CONSIDERANDO SU MEDIA (x).</p> <p><b>PRUEBA "T":</b> ESTA PRUEBA SE UTILISO PARA COMPARAR LA DEGRADACION DE LOS GLUCANOS ENTRE LOS 25 Y 50 DIAS DE INCUBACION PARA CADA CEPA.</p>		

**TABLA 14: ANALISIS ESTADISTICO DEL CONSUMO DE XILANOS POR LOS 8 DICARIOTES ACELULOLITICOS Y LAS 4 CEPAS CONTROL.**

PRUEBAS ESTADISTICAS	RESULTADOS	
ANALISIS DE UARIANZA	DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACION.	
PRUEBA DE DUNCAN	<u>TIEMPO 1</u>	<u>TIEMPO 2</u>
	86 x 92 a 1:00 x 489 b 2:54 x 489 b 56 H1-N1 x No.36 c 56 H1-N1 x 9 H4-N2 d 1:71 x 489 d 16 x 65 e 71 x 48 e 18 x 37 f 8 x 3 f 59 x 48 g 56 H1-N1 x No.24 g	2:54 x 489 a 1:00 x 489 b 56 H1-N1 x 9 H4-N2 b 56 H1-N1 x No.24 c 86 x 92 c 8 x 3 cd 71 x 48 de 18 x 37 fg 1:71 x 489 g 59 x 48 g 16 x 65 h 56 H1-N1 x No.36 i
PRUEBA "T"	8 x 3 Mayor (P=99%) 56 H1-N1 x No. 24 Mayor (P=99%) 56 H1-N1 x No. 36 Mayor (P=99%) 56 H1-N1 x 9 H4-N2 Mayor (P=99%) 1:48 x 489 Mayor (P=99%) 1:71 x 489 Mayor (P=99%) 2:54 x 489 Mayor (P=99%) 16 x 65 Mayor (P=99%) 18 x 37 Mayor (P=99%) 59 x 48 Mayor (P=99%) 71 x 48 Mayor (P=99%) 86 x 92 Mayor (P=99%)	
	<p>ANALISIS DE UARIANZA: ESTE ANALISIS INDICO QUE EXISTIA UNA DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE LOS SUSTRATOS MEDIDO AL DESARROLLO MICELIAL DE LAS DIFERENTES CEPAS.</p> <p>PRUEBA DE DUNCAN: LAS LETRAS DIFERENTES PARA UN MISMO TIEMPO IMPLICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS CEPAS (P=99%). LAS CEPAS SE ORDENARON DE MENOR A MAYOR PIEDADA CONSIDERANDO SU MEDIA (D).</p> <p>PRUEBA "T": ESTE PRUEBA SE UTILISO PARA COMPARAR EL SUSTRATO EN LA DEGRADACION DE XILANOS ENTRE LOS 25 Y 56 DIAS DE INCUBACION PARA CADA CEPAS.</p>	

**TABLA 15: CAMBIOS EN LA PROPORCION DE GLUCANOS Y CARBOHIDRATOS TOTALES CON RESPECTO A LIGNINA EN EL SUSTRATO DESPUES DE 25 Y 50 DIAS DE INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.**

<b>C E P A S</b>	<b>CANTIDAD RELATIVA DE CARBOHIDRATOS (g de carbohidratos/g de lignina)</b>			
	<b>GLUCANOS</b>		<b>CARBOHIDRATOS TOTALES</b>	
	<b>TIEMPO DE INCUBACION</b>			
	<b>25 dias</b>	<b>50 dias</b>	<b>25 dias</b>	<b>50 dias</b>
<b>SUSTRATO (TIEMPO B)</b>	<b>6.89</b>	<b>6.89</b>	<b>8.87</b>	<b>8.87</b>
<b><u>CONTROLES</u></b>				
<b>8 x 3</b>	<b>6.54</b>	<b>9.78</b>	<b>8.28</b>	<b>12.16</b>
<b>96 NI-NI x No.34</b>	<b>7.54</b>	<b>10.19</b>	<b>9.71</b>	<b>12.75</b>
<b>96 NI-NI x No.36</b>	<b>7.32</b>	<b>9.46</b>	<b>9.89</b>	<b>11.18</b>
<b>96 NI-NI x 9 84-NI</b>	<b>8.10</b>	<b>6.55</b>	<b>10.62</b>	<b>8.25</b>
<b><u>DICARIOTES (C-)</u></b>				
<b>1:40 x 409</b>	<b>6.37</b>	<b>11.10</b>	<b>8.49</b>	<b>13.94</b>
<b>1:71 x 409</b>	<b>5.77</b>	<b>11.62</b>	<b>7.82</b>	<b>14.31</b>
<b>2:34 x 409</b>	<b>6.47</b>	<b>10.10</b>	<b>8.52</b>	<b>13.68</b>
<b>16 x 63</b>	<b>5.88</b>	<b>13.87</b>	<b>7.80</b>	<b>16.45</b>
<b>10 x 37</b>	<b>6.51</b>	<b>8.60</b>	<b>8.29</b>	<b>10.43</b>
<b>39 x 40</b>	<b>6.18</b>	<b>10.83</b>	<b>8.04</b>	<b>13.41</b>
<b>71 x 40</b>	<b>5.82</b>	<b>7.34</b>	<b>7.71</b>	<b>8.83</b>
<b>96 x 92</b>	<b>7.30</b>	<b>10.06</b>	<b>9.57</b>	<b>12.66</b>

## DISCUSSION

## DISCUSION

Con este estudio se pretendía mejorar genéticamente 2 mutantes acelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*, las cepas 56 H1-N1 y 9 H4-N2 que habían sido obtenidas en estudios previos y presentaban características muy prometedoras. Se planteó lograr este objetivo por medio de hibridaciones entre cepas acelulolíticas de sus respectivas progenies. De acuerdo a esto, se llevaron a cabo 88 apareamientos entre monocariotes acelulolíticos de tipo progenitor o recombinante. De los apareamientos realizados entre los monocariotes de tipo progenitor todos resultaron positivos, lo cual era de esperarse ya que en este caso las 4 cepas progenitoras (56 H1-N1, 9 H4-N2, Mo.24 y Mo.36) eran totalmente compatibles entre si. En el caso de los apareamientos entre monocariotes de tipo recombinante, de 32 apareamientos sólo los efectuados entre los tipos III 9 H4-N2 x IV 56 H1-N1 y IV 9 H4-N2 x III 56 H1-N1 fueron positivos. Este resultado es difícil de explicar, ya que sólo 2, de las 4 posibles maneras de aparear a los monocariotes recombinantes resultaron negativos (III 9 H4-N2 x III 56 H1-N1 y IV 9 H4-N2 x IV 56 H1-N1).

La posibilidad de que existiera un factor de incompatibilidad común dentro de estas 2 progenies se presenta como poco convincente. Como se sabe los tipos de compatibilidad estan dados por 2 diferentes factores que son: A y B. Para que al aparearse se obtengan dicariotes es necesario que estos factores

sean diferentes. Así los 4 tipos de compatibilidad existentes dentro de una progenie de Pleurotus ostreatus pueden denominarse como:  $A_1B_1$ ,  $A_2B_2$ ,  $A_1B_2$  y  $A_2B_1$ . Los 2 primeros por lo general se consideran como los 2 tipos progenitores, siendo los 2 restantes los recombinantes. Dado que los 4 tipos progenitores de las 2 progenies estudiadas eran compatibles entre sí (las cepas 56 H1-N1, Mo.24, 9 H4-N2 y Mo.36) debería esperarse que todos los apareamientos entre los tipos recombinantes también resultaran positivos. Esto se puede ejemplificar considerando las progenies de las 2 mutantes de la manera siguiente:

<u>DICARIOTE</u>			
56 H1-N1 x Mo.24			
-----			
TIPOS DE COMPATIBILIDAD			
Progenitor		Recombinantes	
$A_1B_1$	$A_2B_2$	$A_1B_2$	$A_2B_1$

<u>DICARIOTE</u>			
9 H4-N2 x Mo.36			
-----			
TIPOS DE COMPATIBILIDAD			
Progenitor		Recombinantes	
$A_5B_5$	$A_6B_6$	$A_5B_6$	$A_6B_5$

Si existiera un factor en común dentro de los recombinantes se vería reflejado también en los progenitores y en este caso no se obtuvo ningún apareamiento negativo.

Para evaluar el carácter (C-) de los 70 dicariotes obtenidos se utilizaron dos métodos. En el primer método se utilizó el medio sales minerales-carbóximetilcelulosa (SM-CMC), en donde se detectaron 6 dicariotes (C-) (Tabla 3). El medio de celulosa enriquecido con DPMA (DPMA-CMC) fue el segundo método utilizado. Se utilizó este medio más rico en nutrientes, ya que en el medio de sales minerales se observó que la mayoría de las cepas presentaron un crecimiento micelial muy pobre. El medio



DPMA-CHC permitió caracterizar a las cepas en forma más rigurosa, eliminando a las cepas de tipo celulolíticas que no manifestaban su carácter por falta de nutrientes. Se consideraron finalmente como cepas con carácter (C-) aquellas que no consumieron la celulosa en ninguno de los dos medios.

Después de utilizar ambas pruebas, de los 70 dicariotes obtenidos únicamente 3 cepas resultaron de tipo (C-) (Tabla 4). Este resultado es interesante ya que estos dicariotes se obtuvieron hibridando monocariotes acelulolíticos, por lo que podría esperarse que los dicariotes resultantes fueran (C-). Para entender estos resultados debe considerarse que los monocariotes acelulolíticos se obtuvieron de las progenies resultantes de apareamientos entre las mutantes 56 H1-N1 y 9 H4-N2 con diferentes monocariotes silvestres el Mo.24 y el Mo.36 respectivamente. Los monocariotes (C-) de cada progenie deben de contener todos los genes requeridos para dicho carácter de acuerdo a la mutante progenitora. Al realizar los apareamientos entre los monocariotes de ambas progenies se esperaría que los dicariotes resultantes fueran de tipo (C-), ya que al estudiar cada una de las progenies por separado siempre que se hibridaron monocariotes (C-) se obtuvieron dicariotes (C-). En el estudio aquí reportado era de esperarse que obtuvieran dicariotes (C-) siempre y cuando en ambas mutantes los mismos genes hubieran sido alterados. El hecho, que en este caso no se haya obtenido tal resultado, sugiere que las 2 mutantes estudiadas difieren en la naturaleza de los genes modificados.

En estudios previos para cada mutante se había determinado el número de genes que controlaban el carácter (C-), siendo de 5 genes para la mutante 56 H1-N1 y de 5 ó 6 genes para la mutante 9 H4-N2 (33 y 34). Los resultados del presente estudio confirman esa diferencia detectada entre las 2 mutantes acelulolíticas, sugiriendo además, que estas se encuentran mutadas en diferentes genes, y que por ello se disminuyó la posibilidad de obtener dicaríotes acelulolíticos.

Una vez identificados los 3 dicaríotes (C-) se evaluaron sus patrones de ataque a la lignocelulosa. En este experimento se emplearon 5 cepas acelulolíticas provenientes de un trabajo previo (35) y 4 cepas testigo. Todas las cepas se inocularon en un sustrato lignocelulósico formulado con paja de trigo, rastrojo de maíz y plote, evaluándose el consumo de los componentes del sustrato a los 25 y 50 días de incubación.

A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas en el consumo de los componentes del sustrato, debidas al desarrollo micelial de las diferentes cepas. En todos los casos se presentaron diferencias altamente significativas entre el sustrato sin inocular y el sustrato inoculado con las diferentes cepas. Por ello se utilizó una Prueba de Duncan para definir las cepas que consumieron la mayor y menor cantidad de cada uno de los componentes del sustrato. Para cada cepa se comparó por medio de una Prueba "t" Student la pérdida o ganancia de cada componente a los 25 y 50 días de incubación.

En las Tablas 12, 13 y 14 se presentan los resultados del análisis estadístico que se llevó a cabo para determinar el consumo de cada componente por las diferentes cepas.

Con respecto al consumo de lignina (Tabla 12) los dicaríotes 16 x 65, 59 x 40 y 1:71 x 489 fueron los que consumieron mayores cantidades (63.00 a 69.00% aproximadamente).

Para el consumo de glucanos (Tabla 13) se observa que las cepas 86 x 92 y 1:48 x 489 presentaron el menor consumo de glucanos (18.81 y 23.00% respectivamente).

En el consumo de xilanos (Tabla 14) todas las cepas presentaron un drástico incremento en la degradación de este componente, de 28 a 62% aproximadamente.

Considerando las proporciones residuales de los componentes de la lignocelulosa, a los 25 y 50 días de incubación se observó que tanto la lignina como los xilanos se incrementaron con respecto al tiempo. Los glucanos por su parte no presentaron tal comportamiento con las 8 cepas (C-) evaluadas. De éstas, únicamente con 5 cepas se observó un incremento, con una no varió y con las 2 restantes se presentó una disminución. Cabe mencionar que el desarrollo micelial de éstas últimas cepas en el sustrato fue bueno o abundante (Tabla 5). Esto sugiere que el sustrato al segundo tiempo de incubación había sido invadido fuertemente por el micelio de las cepas, lo cual ocasionó posiblemente que la cantidad de glucanos en el sustrato aumentara. Dicho aumento se debe a que la pared celular del hongo está constituida principalmente por glucanos y por ello se detecta un incremento

en la cantidad de glucanos en el sustrato. En realidad este comportamiento sólo refleja un buen desarrollo micelial de las cepas en el sustrato.

Con respecto al tiempo en el cual son consumidos los carbohidratos de la lignocelulosa se detectó, que los glucanos en general son consumidos en mayor cantidad a los 25 días de incubación. Sin embargo, los xilanos se consumen en mayor cantidad a los 50 días de incubación (Tablas 13 y 14).

Finalmente se analizó el consumo de carbohidratos con respecto al consumo de lignina durante la incubación. Esta comparación es de importancia ya que permitió seleccionar aquellas cepas capaces de consumir menor cantidad de glucanos por gramo de lignina consumida, es decir aquellas con mayor selectividad por la lignocelulosa.

El consumo de glucanos y carbohidratos totales con respecto al de lignina (Tabla 15); si el valor obtenido es menor al del sustrato sin inocular significa que las cepas presentan menor capacidad para metabolizar a la lignina. Por el contrario cuando este valor aumenta significa que las cepas tienen mayor capacidad para consumir lignina y menor capacidad para consumir celulosa o carbohidratos.

# RESUMEN

## RESUMEN

La lignina actúa como una barrera infranqueable para el uso de los desperdicios lignocelulósicos, ya que se encuentra asociada a polímeros como la celulosa y hemicelulosa, dificultando su degradación. La lignina debe degradarse a compuestos más sencillos para que los desperdicios lignocelulósicos puedan ser utilizados eficientemente. Los microorganismos desempeñan un papel muy importante en la degradación de la lignina, especialmente los hongos de pudrición blanca ya que son los únicos organismos que descomponen y estabilizan eficientemente la lignina, sin embargo los polisacáridos también son degradados.

El objetivo de este trabajo consistió en obtener cepas de *Pleurotus ostreatus*, capaces de llevar a cabo una degradación selectiva de lignina del material lignocelulósico, disminuyendo el consumo de polisacáridos en la menor medida posible. Para ello se realizaron apareamientos entre monocariotes (C-) para obtener dicariotes (C-). Después de seleccionar los dicariotes acelulolíticos resultantes (8), se determinaron los patrones de consumo de la lignocelulosa por estos 8 dicariotes y por 4 cepas testigo. Se encontró que con 2 de los dicariotes (C-) el consumo de lignina se hizo más selectivo, éstas consumieron de 52.41 a 83.13% de lignina y de 23.00 a 43.28% de glucanos, en comparación con las cepas testigo que consumieron de 54.84 a 60.21% de lignina y 38.75 a 43.71% de glucanos.

## **CONCLUSIONES**

### CONCLUSIONES

Con el trabajo de mejoramiento genético realizado se observó posiblemente las alteraciones mutagénicas que presentaban las dos mutantes evaluadas sean diferentes en tipo y número de genes, ya que de los 70 dicaríotes obtenidos al aparear monocaríotes acelulolíticos de sus progenies únicamente se obtuvieron 3 dicaríotes (C-).

Los resultados obtenidos en relación al consumo de glucanos indican una disminución de éste al comparar la cepa 8 x 3 con los valores de los diversos híbridos con genes acelulolíticos. Por ello es posible concluir que el consumo de glucanos disminuye cuando la cepa dicaríotica está formada por al menos una mutante (C-). Esta disminución es mayor cuando el dicaríote en cuestión proviene del apareamiento de 2 mutantes (C-). Con respecto a los dicaríotes mejorados únicamente en el caso de 2 cepas (1:71 x 489 y 89 x 40) dicha proporción se mantuvo igual que la cepa testigo 8 x 3. Las cepas que consumieron menor cantidad de glucanos fueron 1:48 x 489 y la cepa 86 x 92 con 23 y 18% respectivamente. Sin embargo, no fue posible obtener cepas totalmente acelulolíticas. Es por ello necesario que los métodos para seleccionar el carácter (C-) sean optimizados para hacerlos más selectivos.

Al considerar el consumo de los glucanos con respecto al de lignina se observa que la cepa 16 x 65 presenta la relación más favorable. Es decir el consumo de glucanos es el más bajo con respecto al de lignina. Las cepas 1:48 x 489 y 1:71 x 489



obtenidas en el presente trabajo también presentaron una degradación favorable para dicha relación, aunque ligeramente menor a la cepa 16 x 65.

Con respecto a la lignina se observó que este componente se consume en mayor proporción a los 50 días de incubación y los valores alcanzados son en general muy elevados (35.0 a 69.0%).

Como se puede observar las mejores cepas obtenidas en este trabajo fueron 1:46 x 468 y 1:71 x 469 las cuales degradaron de 52.0 a 63.0% de lignina y de 23.0 a 43.0% de glucanos aproximadamente.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Aguilar, A., Hernández, M. y Ramírez B. Delignificación de rastrojo de maíz por Plasmodium ontreatus. Fac. de Química. Tesis para obtener el título de Lic. Químico Farmacéutico Biólogo (1982).
- (2) Ander P. and K.E.Eriksson. Selective Degradation of Wood Components by white-rot. Rev. Physiology Plant., p.p: 41 y 239 (1977).
- (3) Ander P. and K.E. Erikson. Lignin degradation and utilization by microorganisms. In: Progress in Industrial Microbiology. M.J. Bull (Ed.) Elsevier, Amsterdam, N.Y. (1978).
- (4) AOAC (Association of Official Analytical Chemistry), Official Methods of Analysis. 11 th Edition (1980).
- (5) Bassham J.A. Cellulose as a chemical and energy source. In: Cellulose as Chemical and Energy Source. (Ed.). John Wiley. pp: 35-79 (1975).
- (6) Bisaria, R. and M. Madan. Mushroom: Potential Protein Source from Cellulosic Residues Enzyme. Microbiology Technol. 5: 251-259 (1983).
- (7) Burnett J.H. Mycogenetics. (Ed.) John Wiley y Sons. London, England. pp: 11-12 (1975).
- (8) Cote W.A. Wood structure in relation to chemical Composition. In: The Structure, Biosynthesis and Degradation of Wood. Loewus F.A. y V.C Runekes (Ed.) Recent Advances of Phytochemistry, Vol. II. Plenum Press, New York (1977).
- (9) Crawford R.L. Lignin Biodegradation and Transformation. (Ed.) John Wiley. New York (1981).

- (10) Crowley B.E. Comparative Biochemistry of the decay of Sweetgum Sapwood by White-Rot and Brown-Rot Fungi. Technical Bulletin, U.S. Department of Agriculture, pp: 1-9 (1961).
- (11) Chang S.T. World Production of cultivated edible mushrooms in 1986. Mush. J. Tropics. 7: 117-120 (1987).
- (12) Dekker R.F.H. and W.L. Linder. Bioutilization of lignocellulosic waste materials: A review. South African Journal of Science, pp: 65-71 (1979).
- (13) D.G.A.F. Dirección General de Aprovechamientos Forrajeros (1988).
- (14) Eger G. Biology and breeding of Pleurotus. In: The Biology and Cultivation of Edible Fungi. Chang C. y R. Hayes (Ed.). Academic Press New York (1978).
- (15) Effland, J.M. Modified Procedure to Determine Acid-insoluble Lignin in Wood and Pulp. TAPPI. 60(10): 143-144 (1977).
- (16) Guidelines on Management of Agricultural and Agro-industrial Residues Utilization. Industry and Environment Office, UNEP (1988).
- (17) FAO Productin Year Book, (1977).
- (18) Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Pronal. 33: 1-2 (1988).
- (19) Kirk K.T. Effects of Microorganisms on Lignin. Ann. Rev. of Phytopatol., 9: 185-210 (1971).
- (20) Kirk K.T., W.J. Conors and J.G. Zeikus. Advances in understanding the microbiological degradation of lignin. In: The Structure, Biosynthesis and Degradation of Wood. Loewus F.A y V.C. Runeckles (Ed.). Recent Adv. Phytochem., Vol. 11, Plenum Press, New York (1977).
- (21) Kirk K.T. and H.M. Chang. Decomposition of lignin by white-rot fungi. Holzforchung. 28 (6): 217- 222 (1974).

- (22) Kirk K.T and H.M Chang. Decomposition of lignin by white-rot and digestibility of resulting wood. Wood Fiber. 4: 172-179 (1975).
- (23) Kirk K.T and W.E Moore. Removing lignin from wood with rot-fungi and digestibility of resulting wood. Wood Fiber. 4: 172-179 (1972).
- (24) Klein, B. and Weissman M. New Color Reagent for Determination of Hexoses: Determination of Glucose in Blood Serum. Analytical Chemistry. 25(5): 771-774 (1953).
- (25) Leal-Lara H. Sporelessness in the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. A. Genetical Study by Means of a New Dedikaryotization Method. Disertación Doctoral de la Facultad de Farmacia y Química de Alimentos. Philipps Universitat, Marburg, Alemania.
- (26) Leal - Lara H. La Utilización Microbiológica de Desperdicios Lignocelulósicos. Prospectiva de la Biotecnología en México. Ed. UNAM. pp: 93-114.
- (27) Leal-Lara H. Cultivo del Champiñon y otros Macromicetos Comestibles. Prospectiva de la Biotecnología en México. Ed. UNAM. pp: 235-257 (1984).
- (28) Lohar, C.R. Utilization of Agricultural and Agro-industrial Residues: concepts and principles. Industry and Environment. 5(2): 1-3 (1982).
- (29) Markhijani A. and A.D. Poole. Energy and Agriculture in the Third World. Ballinger Press. Cambridge, Mass (1975).
- (30) Martínez, D., (1984). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre desechos agrícolas, I. Obtención de cepas nativas en diferentes medios de cultivo sólido en el laboratorio. Biótica. 9: 238-242 (1984).
- (31) Martínez, D., and G. Guzmán. The cultivation of *Pleurotus ostreatus* on agricultural wastes., II. Cultivation on the coffe pulp. Sci. Cult. Tech. Edible Fungi Symp. Kashmir, India (in press).

- (32) Martínez, D., M. Quirarte., C. Soto., D. Salomones and G. Guzmán. Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agroindustriales en México. Boi. Soc. Mex. Mic. 10: 207-210 (1984).
- (33) Nair N.G. Mushroom as Vegetales. Mushroom Newsletter for the Tropic. 3: 1 (1983).
- (34) Padilla Hurtado F. Mejoramiento genético de una mutante acelulolítica (C-) de *Pleurotus ostreatus*. Tesis para obtener el título Licenciatura de Biólogo U.N.A.M. Facultad de Ciencias (1980).
- (35) Ramírez C.R. Producción y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. Tesis para obtener el título de Maestría. UNAM.
- (36) Sarkanen V.K. and H.L. Mergert. Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions. American Press, New York. pp: 543-549 (1971).
- (37) Sarkanen V.K. y H.C. Ludwig. Interciencia. American Press, New York. pp: 1 y 43 (1972).
- (38) Staton W.R. The microbes potential in resource economy. Proceedings of the Vth. Symposium of the Federation European Microbiological Societies. Viena (Austria) pp: 195-215 (1977).
- (39) Torre Louis M. Aprovechamiento de Esquilmos Agrícolas y Residuos Agroindustriales. Prospectivas de la Biotecnología en México. Ed.UNAM. pp: 219-234 (1984).
- (40) Tracey, M.V. Colorimetric Method for the Determination of Pentoses in the Presence of Hexoses and Uronic Acid. Biochem. 47: 443-436 (1950).
- (41) Walton A.G. y J. Blackwell. Biopolymers. American Press, New York. pp: 23-45 (1973).
- (42) Wilkie, C.R. Cellulose as a Chemical and Energy Source. American Press, New York. pp: 11-18.

- (43) Zadrazil F. Conversion of plant waste to feed by fungi. Abstracts of the Vth. Symposium of the Federation of European Microbiological Societies. Vienna (Austria) (1977).
- (44) Zadrazil F. Cultivation of Pleurotus. In Chang and W.A. Hayes (Eds). The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. Academic Press, New York (1978).
- (45) Zakia Bano. Mineral and heavy metal, contents in the sporophores of Pleurotus ostreatus. Mushroom Newsletter for the Tropic. 2: 3-8 (1981).
- (46) Zakia Bano., Bhagua S., and Srinivason K.S.. Essential amino acid composition and proximate analysis of the mushroom Pleurotus euos and Pleurotus florida. Mushroom Newsletter for the Tropic. 1(3): 2-10 (1981).

# APENDICE



## APENDICE

### 8.1 MATERIAL Y EQUIPO.

#### 8.1.1 Medios de cultivo.

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

#### 8.1.2 Reactivos analíticos.

Todos los reactivos son J.T Baker grado analítico.

- Acido acético glacial
- Acido cromotrópico
- Acido fosfórico
- Acido oxálico
- Acido sulfúrico
- Anilina
- Carbonato de calcio
- Carbonato de sodio
- Carboximetil celulosa (CMC)
- Citrato férrico amoniacal
- Cloruro de calcio
- Clorhidrato de tiamina
- Deoxicolato de sodio
- Fosfato de amonio
- Fosfato ácido de potasio
- Glucosa
- Sulfato de calcio
- Sulfato de cobre

- Sulfato de magnesio
- Sulfato de manganeso
- Sulfato de zinc

### 8.1.3 Material de laboratorio.

- |                           |                                |
|---------------------------|--------------------------------|
| - Agitadores              | - Ligas                        |
| - Aza de nicromel         | - Matraz Erlenmeyer de 1000 ml |
| - Bolsas de polietileno   | - Matraz Kitasato de 1000 ml   |
| - Cajas Petri desechables | - Mechero                      |
| - Crisoles                | - Papel aluminio               |
| - Desecador               | - Papel filtro (Whatman No.1)  |
| - Embudos                 | - Pinzas para crisol           |
| - Embudo Büchner          | - Pipetas 1 ml                 |
| - Frascos de 1000 ml      | - Pipetas 5 ml                 |
| - Gradillas               | - Pipetas 10 ml                |
| - Hule espuma             |                                |

### 8.1.4 Equipo.

- Agitador de tubos de ensayo (Super-Mixer)
- Autoclave vertical (AESA)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Caldera (Brabender)
- Campana de flujo laminar (Veco)
- Centrifuga (International Clinical Centrifuge)
- Espectrofotómetro (Bausch & Lomb)
- Estufa de secado (Felisa)

- Incubadora (Felisa)
- Licuadora (Phillips TX 3000)
- Microscopio (Carl Zeiss 1.25x)
- Molino (Brabander)
- Potenciómetro (Sargent-Walch. Model LS)
- Refrigerador (Royal Colther)

## 8.2 CEPAS FUNGICAS.

Para el presente trabajo se utilizaron monocariotes de las progenies de los dicariotes 56 H1-N1 x Mo. 24 y 9 H4-N2 x Mo. 36, la Tabla 1 muestra las principales características de las cepas. También se utilizaron cepas dicarióticas con diferente capacidad para consumir la celulosa que habían sido obtenidas en investigaciones previas (35), pero que no habían sido estudiadas en relación a su patrón de ataque a los componentes de la lignocelulosa. Estos dicariotes son:

18 x 85  
 18 x 37  
 59 x 40  
 71 x 48  
 88 x 92

Se usaron diferentes cepas como testigo tanto para las pruebas de consumo de celulosa como para determinar los patrones de consumo de las cepas obtenidas en este trabajo. En la Tabla 16 se muestran las características principales de estas cepas testigo.

Todas las cepas utilizadas para el presente trabajo fueron proporcionadas por el Dr. Heriberto Leal Lara (Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM).

### 8.3 MEDIOS DE CULTIVO.

#### 8.3.1 Medio de agar extracto de malta.

Para preparar 500 ml de medio de extracto de malta agar, pesar 7.5 g de extracto de malta y 10 g de agar, colocarlos en un matraz Erlenmeyer de un litro. Adicionar 500 ml de agua destilada gradualmente, procurando disolver los reactivos. A continuación tapar el matraz y dejar reposar durante 20 minutos. Posteriormente, esterilizar en autoclave a 121°C y 15 kilos de presión durante 15 minutos. Vaciar el medio estéril en cajas Petri de plástico de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio guardar las cajas petri en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

#### 8.3.2 Medio de agar extracto malta deproteinado (DPMA).

Preparar este medio a partir de una solución concentrada de extracto de malta deproteinado. Para esto pesar 20 g de extracto de malta y disolver en 250 ml de agua destilada. Medir el pH de la solución anterior y elevar a 1.5 unidades con una solución de NaOH 1N. Después adicionar 1.4 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , mezclar y esterilizar en autoclave a 121°C y 15 kilos de presión durante

20 minutos. Una vez frío filtrar para obtener la solución concentrada.

Posteriormente tomar 75 ml del filtrado y mezclar con 425 ml de agua destilada y 10 g de agar. Después de 20 minutos de reposo esterilizar en autoclave a 121°C y 15 kilos de presión durante 15 minutos. Vaciar el medio estéril en cajas Petri desechables de 9 cm de diámetro, y guardarlas en bolsas de polietileno.

### 8.3.3 Medio de doble capa para definir carácter aceluolítico.

Este medio esta compuesto por dos capas, la primera de sales minerales (SM) y la segunda capa de carboxi-metil celulosa (CMC). Se prepara de la siguiente manera:

Preparar un litro de solución de la primera capa, en 500 ml de agua destilada disolver las siguientes sales en el orden indicado:

<u>SALES</u>	<u>CANTIDAD</u>
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Fosfato de amonio)	4.0 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Fosfato ácido de potasio)	0.2 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Fosfato diácido de potasio)	0.8 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de zinc)	4.4 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de manganeso)	5.0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de cobre)	1.0 mg
$\text{FeNH}_4\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Citrato ferrico amoniacal)	5.0 mg
$\text{CaCl}_2$ (Cloruro de calcio)	20.0 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de magnesio)	0.69 g

Disolver las últimas dos sales por separado e integrar al volumen total de un litro. Para preparar el medio ajustar el pH de la solución de sales a 4.5 y adicionar 20 g de agar por cada litro de medio, dejar reposar durante 20 minutos y esterilizar en autoclave a 121°C y 15 kilos de presión durante 15 minutos. A continuación vaciar 15 ml del medio en cada caja Petri desechable y se guardaron en bolsas de polietileno.

Para la preparación de la segunda capa carboximetilcelulosa (CMC) se requiere someter a la CMC a un tratamiento ácido (Método de Walseth) que permite su hidratación. Para este tratamiento Walseth, dejar enfriar 4 g de CMC y 51 ml de ácido fosfórico durante 30 minutos. Posteriormente mezclar gradualmente pequeñas cantidades de CMC y ácido fosfórico en un vaso de precipitados de 100 ml previamente enfriado, tratándose de incorporar al ácido con la ayuda de un agitador. Continuar esta operación hasta que toda la CMC se incorpore en forma homogénea con el ácido. Dejar enfriar la mezcla homogénea durante dos horas. A continuación licuar con 500 ml de agua destilada y filtrar con vacío para eliminar el exceso de ácido. Lavar el precipitado obtenido de igual forma, dos veces más y dejar en 500 ml de una solución de carbonato de sodio al 1.0% durante 8 horas para neutralizar el exceso de acidez. Al día siguiente lavar nuevamente 3 veces más con agua destilada. A continuación determinar la humedad del precipitado obtenido y suspenderlo en 250 ml de la solución de sales. Después de conocer la humedad adicionar la cantidad necesaria de solución de sales para obtener una suspensión de CMC al 1%.

Para preparar el medio de CMC ajustar el pH de la suspensión de celulosa Walseth a 4.5 y adicionar 0.05% de glucosa y 2.0% de agar. Dejar reposar durante 20 minutos y calentar hasta ebullición. Posteriormente, vaciar 10 ml del medio en tubos de ensayo y se tapar para ser esterilizados en autoclave a 121°C y 15 kilos de presión durante 15 minutos. A cada tubo con medio estéril adicionar en condiciones asépticas 50 µl de una solución de deoxicolato de sodio al 0.04% y 10 µl de solución de tiamina al 0.01%. Finalmente agitar los tubos para homogeneizar el medio y vaciar cada tubo sobre las cajas Petri que contienen el medio de sales minerales o los medios de DPMA.

Se definieron como cepas con carácter acelulolítico aquellas que no formaron halo en el medio de celulosa, lo cual indica que su metabolismo para consumir celulosa ha sido modificado.

#### 8.3.4 Medio de grano estéril para la producción del inóculo.

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 y así evaluar la forma en que éste fue consumido.

Para preparar el inóculo de grano, lavar el grano de trigo y cocer en agua a temperatura de ebullición durante 60 minutos. A continuación drenar el agua caliente y enfriar el

grano al chorro de agua. Pesar el grano frío y adicionarle  $\text{CaSO}_4$  al 1.3% y  $\text{CaCO}_3$  al 0.3%, mezclar y se colocar en frascos de vidrio y llenarlos hasta la mitad de su capacidad. Tapar los frascos de vidrio con hule espuma y papel aluminio, para posteriormente esterilizarlos a  $121^\circ\text{C}$  y 15 kilos de presión durante una hora. Una vez frío el grano, inocular cada frasco con el micelio proveniente de una caja Petri resebrada una semana antes. Incubar los frascos inoculados a  $28^\circ\text{C}$  durante 8 días.

#### 8.3.5 Sustrato de paja para evaluar el consumo de la lignocelulosa.

El sustrato lignocelulósico se formula con paja de trigo, rastrojo de maíz y olote. El acondicionamiento del sustrato es por medio de una fermentación a cielo abierto durante 3 días, para posteriormente pasteurizarlo a  $85\pm 5^\circ\text{C}$  durante 120 minutos. A continuación enfriar hasta una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , esparciéndolo sobre una mesa estéril. Para cada cepa preparar 8 bolsas de 1 Kg del sustrato pasteurizado. El sustrato se inocula al 3.0% con inóculo de grano e incuba a  $28\pm 2^\circ\text{C}$ .



#### 8.4. CALCULOS PARA OBTENER LA COMPOSICION DEL SUSTRATO EXPRESADA EN BASE CONSTANTE (CENIZAS) Y LOS PORCENTAJES DE DEGRADACION DE CADA COMPONENTE.

Durante el periodo de incubación, los componentes orgánicos del sustrato son degradados a bióxido de carbono y agua, de la cual parte se evapora y parte queda retenida en el sustrato. Sin embargo, el contenido absoluto de minerales se mantiene constante, no así su porcentaje en relación con los demás componentes, ya que al disminuir su cantidad la proporción o porcentaje de cenizas se incrementa. Considerando entonces que la cantidad absoluta de cenizas se mantiene constante durante todo el experimento, es posible determinar la pérdida de cada uno de los componentes del sustrato.

##### 1.- CALCULOS PARA EXPRESAR LA COMPOSICION EN BASE CONSTANTE.

La composición en base a cenizas para cada cepa se calcula dividiendo los 5 valores de cada componente entre el valor promedio de sus cenizas. De esta forma es posible determinar las variaciones en el consumo de cada componente a los diferentes tiempos de incubación.

Así por ejemplo para calcular la composición en base a cenizas de la paja sin inocular, cada uno de los datos de composición se divide entre su valor promedio de cenizas (Tabla 17).

2.- CALCULOS PARA OBTENER LOS PORCENTAJES DE PERDIDA DE CADA COMPONENTE.

Los porcentajes de pérdida de cada componente se calculan a partir de la composición en base constante por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Degradación} = \frac{\frac{g \text{ componente}}{g \text{ cenizas (t=0)}} - \frac{g \text{ componente}}{g \text{ cenizas (t=t)}}}{\frac{g \text{ componente}}{g \text{ cenizas (t=0)}}} \times 100$$

En donde:

t = 0 Componente en base a cenizas de la paja sin inocular.

t = t Componente en base a cenizas para cada cepa a los 25 y 50 días de incubación.

Con el propósito de conocer las variaciones en cada cepa debido a las repeticiones, se aplica la fórmula anterior para cada uno de los valores de cada componente con respecto al valor promedio de cada componente del sustrato sin inocular.

Así por ejemplo el porcentaje de degradación de la lignina para la cepa 8 x 3 a los 25 días de incubación se calcula de la siguiente forma:

DATOS:

$$\frac{g \text{ componente}}{g \text{ lignina (t=0)}} = 1.24$$

$$\frac{g \text{ componente}}{g \text{ lignina (t=25)}}$$

1.01  
1.01  
0.98

Pérdida de lignina (%)

1.24 - 1.01/1.24 = 18.55  
1.24 - 1.01/1.24 = 18.55  
1.24 - 0.98/1.24 = 20.97

% Pérdida de lignina = 19.36±1.40

**TABLA 16: PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS DE Pleurotus ostreatus UTILIZADAS COMO CONTROLES.**

<b>CEPAS</b>	<b>CARACTERISTICAS</b>
<b>B x 3</b>	HIBRIDO OBTENIDO POR EL DR. H. LEAL, CON CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO VIGOROSO Y FACILIDAD PARA PRODUCIR ESPOROFOROS.
<b>56 H1-N1 x No. 24</b>	HIBRIDO PRODUCIDO POR M.B. RAMIREZ C.R., A PARTIR DE UNA MUTANTE (C-) Y UN MONOCARIOTE SILVESTRE.
<b>9 H4-N2</b>	MUTANTE OBTENIDO POR ACCION DEL MUTAGENO MNNG (TIPO DE COMPATIBILIDAD II).
<b>No. 24</b>	MONOCARIOTE FRUCTIFICANTE CON VIGOROSO CRECIMIENTO MICELIAR.
<b>No. 36</b>	MONOCARIOTE FRUCTIFICANTE CON VIGOROSO CRECIMIENTO MICELIAR.

**TABLA 17: COMPOSICION EN BASE A CENIZAS DE LA PAJA DE TRIGO-RASTROJO DE MAIZ-OLOTE SIN INOCULAR.**

<b>COMPOSICION DE LA PAJA DE TRIGO SIN INOCULAR</b>				
<b>REPLICA</b>	<b>COMPONENTES</b>			
	<b>CENIZAS</b>	<b>LIGNINA</b>	<b>GLUCANOS</b>	<b>XILANOS</b>
<b>1</b>	<b>7.42</b>	<b>9.60</b>	<b>64.32</b>	<b>18.20</b>
<b>2</b>	<b>7.74</b>	<b>9.85</b>	<b>64.20</b>	<b>18.20</b>
<b>3</b>	<b>7.53</b>	<b>9.98</b>	<b>64.00</b>	<b>18.20</b>
<b>4</b>	<b>7.39</b>	<b>8.53</b>	<b>64.50</b>	<b>18.77</b>
<b>5</b>	<b>7.62</b>	<b>8.80</b>	<b>64.20</b>	<b>19.10</b>
<b>COMPOSICION EN BASE A CENIZAS</b>				
<b><math>\bar{x} = 7.54</math></b>	<b>1.27</b>	<b>8.53</b>	<b>2.41</b>	
	<b>1.31</b>	<b>8.51</b>	<b>2.41</b>	
	<b>1.32</b>	<b>8.49</b>	<b>2.42</b>	
	<b>1.13</b>	<b>8.55</b>	<b>2.49</b>	
	<b><u>1.17</u></b>	<b><u>8.51</u></b>	<b><u>2.53</u></b>	
	<b>1.24'0.09</b>	<b>8.52'0.02</b>	<b>2.45'0.05</b>	