

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA



// ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA FASE MICELIAL DE
CRECIMIENTO DE *Pleurotus ostreatus* //

TESIS
U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

I. B. Q. I. MARIA DEL CARMEN / SANCHEZ HERNANDEZ,

MEXICO, D. F.

OCTUBRE DE 1994

94250256

153959

A mis padres, Leonila y Francisco,
y hermanos, por su cariño y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gustavo Viniegra González, de quien recibí asesoría inmejorable. A las Autoridades de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, a través del Dr. Luis Antonio Angulo Montejo, por su apoyo en la realización de esta maestría y para continuar mi formación científica. A mi colega Q.F.B. Porfirio Martínez Ortiz, por enseñarme teoría y práctica sobre Basidiomicetos. A los socios de la empresa Biotecnología Agropecuaria S. A. de C. V., en especial al M.V.Z. Alfonso Soto Sánchez, por permitirme experimentar a nivel planta productora las cepas empleadas en este estudio. A los Dres. Ernesto Favela Torres y Hermilo Leal Lara, por sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado.

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un método para seleccionar en el laboratorio, las cepas de *Pleurotus ostreatus* que más rápido fructifican en su medio habitual de producción, ya que este carácter es fundamental para el desarrollo de la industria productora de estos hongos comestibles, que ocupan el segundo lugar mundial en el cultivo y son de gran interés para la "micogastronomía".

Se evaluó el comportamiento de la fase micelial y de basidiocarpo, de seis cepas de *Pleurotus ostreatus*, tres del Laboratorio de biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (C.I.C.B-U.A.T.): UAT-PO3, UAT-PO4 y UAT-PO7; y tres cepas de colección de la American Type Culture Collection (A.T.C.C.): ATCC-32783, ATCC-38537 y ATCC-58052. Se estudió su fase micelial a nivel laboratorio, en diferentes concentraciones del análogo tóxico de la glucosa, 2-desoxiglucosa (2-DG); y la interacción de éste tóxico con la glucosa y el almidón empleados como fuentes de carbono, determinando; velocidad de crecimiento radial (u_r), diámetro de las hifas distales (D_{hd}), y longitud de las hifas distales (L_{hd}), empleando la técnica del procesamiento digital de imágenes, además de la velocidad de crecimiento específica (μ_{cal}) y factor de rendimiento en caja Petri ($Y_{x/s}$). A nivel planta productora se desarrollaron las cepas en paja de trigo, evaluando el tiempo de fructificación (tf), % de eficiencia biológica (% E.B.) y productividad (PR).

En base a los resultados obtenidos se encontró una fuerte correlación entre el crecimiento micelial de las cepas en 2-desoxiglucosa y el tiempo de fructificación. Indicando que las cepas que son resistentes en el laboratorio a 2-DG, fructificaron tempranamente en planta productora y presentaron el doble de productividad (Kg de hongo fresco/tonelada de sustrato seco por día), que las cepas sensibles a 2-DG.

Estos estudios permiten inferir el comportamiento de las cepas de *Pleurotus ostreatus* a nivel de producción, en base a manifestaciones fisiológicas a nivel laboratorio empleando como agente selectivo la 2-DG, además de brindar excelentes oportunidades para investigación de la morfogénesis.

INDICE GENERAL

RESUMEN.	4
INDICE GENERAL.	5
INDICE DE FIGURAS.	8
INDICE DE TABLAS.	10
ABREVIATURAS USADAS.	11
1. INTRODUCCION	13
1.1. Composición de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	15
1.2. Taxonomía del género <i>Pleurotus</i> .	16
1.2.1. Posición taxonómica.	17
1.2.1. Definición del género <i>Pleurotus</i> .	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1. Crecimiento de Basidiomicetos sobre diversas fuentes de carbono y nitrógeno.	19
2.1.1. Asimilación de la fuente de nitrógeno.	19
2.1.2. Asimilación de la fuente de carbono.	21
2.2. Morfogénesis en Basidiomicetos.	24
2.3. Efecto de la 2-desoxiglucosa en Basidiomicetos y otros hongos.	31
2.4. Empleo de la técnica del análisis de imágenes para el estudio de hongos.	33
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo general.	35
3.2. Objetivos específicos.	35
4. HIPOTESIS	36
5. METODOLOGIA	37
5.1. Cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	37
5.2. Propagación de la fase micelial y obtención del inóculo.	38
5.3. Medios de cultivo.	38

5.4. Equipo experimental.	39
5.5. Estudios realizados.	39
5.5.1. Velocidad de crecimiento radial (u_r).	39
5.5.1.1. Fundamentos teóricos para el cálculo de la velocidad de crecimiento radial.	39
5.5.2. Diámetro (D_{hd}) y longitud de la hifa distal (L_{hd}).	41
5.5.3. Evaluación de la velocidad de crecimiento específica (μ_{cal}).	41
5.5.3.1. Fundamentos teóricos para el cálculo de la velocidad de crecimiento específica.	41
5.5.4. Consumo de glucosa y cuantificación de biomasa.	44
5.5.5. Evaluación del factor de rendimiento en caja Petri ($Y_{x/s}$).	45
5.5.5.1. Fundamentos teóricos para el cálculo del factor de rendimiento.	45
5.5.6. Empleo de la técnica del procesamiento digital de imágenes.	46
5.5.7. Comportamiento de las cepas en planta productora.	46
5.6. Análisis estadístico.	47
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	48
6.1. Velocidad de crecimiento radial.	48
6.2. Diámetro de la hifa distal (D_{hd}).	53
6.3. Longitud de hifas distales (L_{hd}).	56
6.4. Tasa específica de crecimiento (μ_{cal}).	59
6.5. Consumo de glucosa y producción de biomasa.	64
6.5.1. Porcentaje de consumo de glucosa.	64
6.5.2. Producción de biomasa.	67
6.6. Rendimiento en caja petri ($Y_{x/s}$).	70
6.7. Procesamiento digital de imágenes.	74

6.8. Comportamiento de las cepas en planta productora.	79
6.9. Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i>	81
6.9.1. Efecto de la temperatura en la u_r .	82
6.9.2. Efecto de la temperatura en el D_{hd} .	84
6.9.3. Efecto de la temperatura en la L_{hd} .	85
6.9.4. Efecto de la temperatura en la μ_{cal} .	86
7. CONCLUSIONES	96
8. BIBLIOGRAFIA	99

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Mecanismo propuesto en la interacción metabólica de la síntesis de nuevas microfibrillas de quitina, durante la elongación de células del estípite de <i>Coprinus cinereus</i>	28
FIGURA 2.	Ciclo de reproducción del género <i>Pleurotus</i>	30
FIGURA 3.	Curvas ideales que representan la velocidad de crecimiento radial (u_r).....	40
FIGURA 4.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la velocidad de crecimiento radial (u_r), de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a 25 °C.....	50
FIGURA 5.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre el diámetro de las hifas distales (D_{hd}), de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a 25 °C.....	55
FIGURA 6.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la longitud de las hifas distales (L_{hd}), de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a 25 °C.....	58
FIGURA 7.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la velocidad de crecimiento específica (μ_{cal}), de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a 25 °C.....	61
FIGURA 8.	Porcentaje de consumo de glucosa de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a los 5 y 10 días de desarrollo a 25 °C.....	66
FIGURA 9.	Producción de biomasa de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a los 5 y 10 días de desarrollo a 25 °C.....	69
FIGURA 10.	Rendimiento en caja Petri ($Y_{x/s}$) de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a los 5 y 10 días de desarrollo a 25 °C.....	72
FIGURA 11.	Sistema de procesamiento digital de imágenes.....	74
FIGURA 12.	Hifa distal de la cepa ATCC-58052, desarrollada en el medio de cultivo M1.....	75
FIGURA 13.	Acercamiento de la hifa distal de la cepa UAT-PO7, desarrollada en el medio de cultivo M1.....	75
FIGURA 14.	Acercamiento de la hifa distal de la cepa UAT-PO3, desarrollada en el medio de cultivo M2.....	76
FIGURA 15.	Hifas distales de la cepa ATCC-38537, desarrollada en el medio de cultivo M3.....	76

FIGURA 16. Hifas distales de la cepa ATCC-58052, desarrollada en el medio de cultivo M5.....	77
FIGURA 17. Hifa distal de la cepa ATCC-32783, desarrollada en el medio de cultivo M6.....	77
FIGURA 18. Hifa distal de la cepa ATCC-38537, desarrollada en el medio de cultivo M7.....	78
FIGURA 19. Hifas distales de la cepa ATCC-38537, desarrollada en el medio de cultivo M8.....	78
FIGURA 20. Fructificación <i>in vitro</i> de la cepa UAT-PO4 en el medio de cultivo M2.....	92
FIGURA 21. Fructificación <i>in vitro</i> de la cepa UAT-PO7 en el medio de cultivo M2.....	92
FIGURA 22. Basidiocarpo de la cepa UAT-PO7.....	93
FIGURA 23. Basidiocarpo de la cepa UAT-PO4.....	93
FIGURA 24. Basidiocarpo de la cepa ATCC-38537.....	94
FIGURA 25. Basidiocarpo de la cepa UAT-PO3.....	94
FIGURA 26. Basidiocarpo de la cepa ATCC-58052.....	95
FIGURA 27. Basidiocarpo de la cepa ATCC-32783.....	95

INDICE DE TABLAS

TABLA I.	Composición del basidiocarpo de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	16
TABLA II.	Características de las cepas experimentadas.....	37
TABLA III.	Composición de los medios de cultivo empleados.....	38
TABLA IV.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la velocidad de crecimiento radial (u_r), de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a 25 °C.....	49
TABLA V.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre el diámetro de las hifas distales (D_{hd}), de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a 25 °C.....	54
TABLA VI.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la longitud de las hifas distales (L_{hd}), de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a 25 °C.....	57
TABLA VII.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la velocidad de crecimiento específica (μ_{cal}), de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a 25 °C.....	60
TABLA VIII.	Rendimiento en caja Petri ($Y_{x/s}$), de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a 5 y 10 días de desarrollo a 25 °C.....	71
TABLA IX.	Comportamiento de diferentes cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> en producción.....	80
TABLA X.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la velocidad de crecimiento radial (u_r), de <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes temperaturas.....	88
TABLA XI.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre el diámetro de las hifas distales (D_{hd}), de <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes temperaturas.....	89
TABLA XII.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la longitud de las hifas distales (L_{hd}), de <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes temperaturas.....	90
TABLA XIII.	Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la velocidad de crecimiento específica (μ_{cal}), de <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes temperaturas.....	91

ABREVIATURAS USADAS.

AcCoA: Acetil coenzima A.
AMP: Adenosin monofosfato.
AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.
ATCC: American Type Culture Collection.
ATP: Adenosin trifosfato.
biom: Biomasa.
C/N: Relación carbono-nitrógeno.
2-DG: 2-desoxiglucosa.
dgr: Resistencia a 2-desoxiglucosa.
D_{hd}: Diámetro de hifas distales.
%EB: Porcentaje de eficiencia biológica.
EMP: Vía Embden-Meyerhof-Parnas.
FIG: Figura.
Fru6P: Fructosa-6-fosfato.
g/L: Gramos por litro.
g: Gramos.
glu: Glucosa.
h: Horas.
HMP: Vía de la hexosa monofosfato.
Kg: Kilogramos.
L_{hd}: Longitud de hifas distales.
M: Molar.
μcal: Tasa específica de crecimiento.
mg: Miligramos.
min: minutos.
ml: mililitros.
μm: Micrómetros.
NacGlc: N-acetilglucosamina.
pH: Potencial de hidrógeno.
PR: Productividad.
RNA: Acido ribonucleico.
SAS: Statistical Analysis Sistem.

tf: tiempo de fructificación.

UAT: Universidad Autónoma de Tlaxcala.

UDP-NacGlc: Uridin difosfato-N-acetilglucosamina.

UDP: Uridin difosfato.

u_r : Velocidad de crecimiento radial.

UTP: Uridin trifosfato.

$Y_{x/s}$: Factor de rendimiento.

1. INTRODUCCION.

Los hongos son el grupo más grande de organismos en el mundo después de los insectos, se conocen 69,000 especies que comprenden hongos microscópicos y macroscópicos, constituyendo solo un cinco por ciento del total de las 1.5×10^6 especies existentes en la tierra. En las colecciones de hongos se conservan 250,000 cepas que representan 11,500 especies; siendo un 17% de las especies de hongos conocidos y apenas un 0.8% del total de las especies existentes (HAWSWORTH, 1991).

Son aproximadamente 10,000 especies conocidas de hongos macroscópicos, que constan de una fase vegetativa (micelio) y una fase reproductora o carpóforo (cuerpo fructífero). Los cuerpos fructíferos que forman, pueden ser comestibles o no comestibles, dependiendo de su textura y consistencia, y venenosos. En México existen más de 200 especies de hongos comestibles. Entre los hongos comestibles existen especies micorrízicas (asociadas simbióticamente a las raíces de los árboles), parásitas o saprófitas. Se han logrado cultivar en forma experimental en laboratorios de diversas partes del mundo, aproximadamente 80 especies fundamentalmente saprófitas, con excepción de algunas micorrízicas; 22 han sido cultivadas comercialmente y sólo 10 se producen a escala industrial sobre residuos lignocelulósicos (MARTINEZ y col., 1993).

Entre los diversos procesos controlados para la explotación de la agricultura y los desechos forestales en el mundo, el cultivo de hongos comestibles no tiene comparación (WOOD, 1985). El valor de la producción global estimada en dólares por año ha sido de 3.2×10^{12} , comparado con el valor estimado de 4.8×10^8 para las enzimas y 8×10^6 - 16×10^6 para los pesticidas microbiológicos (WOOD, 1989).

Cada año se emplean 300,000 toneladas de pajas, como composta para la producción de hongos comestibles (WOOD, 1989). Este uso a gran escala de los desechos ligninocelulósicos por fermentación en estado sólido, que requiere menos energía que la fermentación líquida, hace del cultivo de hongos uno de los pocos procesos económicamente viables para la bioconversión de esos desechos (ZOHAR y col., 1992; DURRANT y col., 1991).

La lignina, celulosa y hemicelulosa, son los principales componentes estructurales de los tejidos vegetales y la celulosa es el polímero biológico más abundante en la tierra. Se calcula que se forman por fotosíntesis de las plantas 28×10^{12} toneladas por año (BUSSELL, 1991). La lignina es el polímero aromático renovable más abundante y ampliamente distribuido en la biosfera (BOOMINATHAN y ADINARAYANA, 1992) y se estima que se producen 20×10^9 toneladas por año. La lignina constituye 20-30% del peso seco de las plantas leñosas, en la pared celular de las plantas se encuentra mezclada y ocasionalmente unida covalentemente a la hemicelulosa formando una matriz alrededor de las microfibrillas de la celulosa (BOOMINATHAN y ADINARAYANA, 1992; BUSSELL, 1991).

Los Basidiomicetos son los hongos biodegradadores de lignina más efectivos, metabolizan completamente el polímero, rompiendo la matriz que forma. Tienen una capacidad enzimática para usar los componentes de la celulosa y hemicelulosa como fuente de carbono y energía, haciendo el sólido más susceptible a la acción enzimática de otros microorganismos, como bacterias del rumen por ejemplo (ROLZ y col., 1986).

Específicamente en *Pleurotus ostreatus* se encontró que produce laccasa (EC 1.14.18.1), una enzima fenol oxidasa extracelular producida por Basidiomicetos, que induce alguna degradación oxidativa de la lignina y cataliza la polimerización de pequeñas moléculas fenólicas provenientes de esta degradación (MILSTEIN y col., 1988; HIGUCHI, 1990; SANNIA y col., 1991; BETTS y KING, 1991; ELISASHVILI y col., 1992).

El *Pleurotus ostreatus* "ostrá" o "seta", es una de las especies más cultivadas en el mundo después del champiñon o *Agaricus bisporus* (GUINBERTEAU, 1990). En Europa, Italia conserva el primer lugar en producción de *Pleurotus ostreatus*, con 8 a 10 mil toneladas por año, seguida por Hungría con 3 mil toneladas por año y, Alemania y Francia producen 2 mil toneladas por año cada uno (OLIVIER y DELMAS, 1987). La demanda de este hongo es fuerte, pero la producción es muy irregular, originando como consecuencia un mercado desorganizado, siendo la producción insuficiente para sus propios mercados, porque su cultivo requiere un alto nivel de técnica, selección de sustratos específicos y asequibles, adaptación de las condiciones ambientales a las fuertes exigencias del *Pleurotus ostreatus* en su cultivo y control de los competidores en la composta, como hongos filamentosos y bacterias (ZADRAZIL, 1978; LABORDE, 1987). Por lo que la producción masiva y sistemática exige seleccionar y mejorar las especies por su capacidad de colonizar diferentes sustratos, de fructificar y por su rendimiento económico (OLIVIER y DELMAS, 1987), parámetros que repercutirán importantemente en la rentabilidad del cultivo.

Los hongos ocupan un lugar importante en la alimentación, debido a sus características organolépticas originales y nutricionales, y particularmente, *Pleurotus ostreatus* es muy apreciado por quienes lo han degustado y su cultivo tiene un futuro promisorio (OLIVIER y DELMAS, 1987).

1.1 COMPOSICION DE *Pleurotus ostreatus*.

GRISAN y SANDS (1978), HADAR y COHEN-ARAZI (1986), LABORDE (1988), RAI y col. (1988), realizaron investigaciones sobre las propiedades nutricionales y composición del *Pleurotus ostreatus*, indicando que contiene los aminoácidos esenciales y no esenciales para el humano, aproximadamente en la misma cantidad que el huevo de gallina, un número apreciable de vitaminas eficaces en la circulación, B1 y B2 útiles contra los dolores reumáticos y para

el crecimiento. Es muy digerible mejora el tránsito intestinal y es conveniente para los regímenes bajos en calorías, posee un valor energético de 367 kilocalorías; y humedad de 85-93%, además de la composición específica, mostrada en la TABLA I.

TABLA I. COMPOSICION DEL BASIDIOCARPO DE *Pleurotus ostreatus*.

COMPOSICION	% EN PESO SECO
Carbohidratos	53.8
Proteína	26.8
Glucógeno	13.4
Fibra	12.68
Cenizas	7.8
Azúcares solubles	6.9
Azúcares no reductores	6.45
N Total	4.0
Acidos grasos	1.7
Fósforo	1.4
RNA	1.0
Azúcares reductores	0.437
Vitamina C	0.0324
Calcio	0.02
Hierro	0.019

1.2 TAXONOMIA DEL GENERO *Pleurotus*.

Pleurotus ostreatus es una de las primeras especies en ser cultivadas. Se encuentra relacionado con una gama de especies o variedades comerciales y, debido a su variada morfología y exigencias fisiológicas, se utiliza como progenitor en los programas de hibridación y creación de variedades. Es importante recolectar el *Pleurotus ostreatus* y las múltiples especies de interés agronómico en el mundo, para constituir una reserva interesante de germoplasma, sobre todo de las especies típicas o autóctonas de cada país donde se distribuye este género (GUINBERTEAU, 1990).

1.2.1 Posición taxonómica.

De acuerdo a los criterios taxonómicos de GUINBERTEAU (1990) los hongos del género *Pleurotus* pertenecen a:

Clase Basidiomicetos: Grupo de hongos que tienen en común la presencia de basidios que emiten basidiosporas exógenas al término de la reproducción sexual. Entre los basidiomicetos se encuentran los hongos más evolucionados y comprenden en particular la mayor parte de especies importantes que fructifican en forma de carpóforo.

Subclase Homobasidiomycetes o Autobasidiomycetes: Hongos con basidios unicelulares no tabicados y completos (homobasidio) dispuestos en estratos regulares constituyen un himenio.

Orden Hymenomycetales: Basidiomicetos macroscópicos con sombrero o píleo.

Familia Pleurotaceae: Familia de transición entre los Aphylophorales o Polyporales, y los Agaricomycetidae. Hongos carnosos lignícolas, carnosos cerrados pero no coriáceos (no suberoso) con láminas decurrentes o adnadas. Esta familia comprende una docena de géneros entre ellos el *Pleurotus*. Encontramos en esta familia de géneros, esporas de tipo poliporoide (cilindradas o subalantoide, a veces rosadas) que las comparan con polyporaceae ss. str.

1.2.2 Definición del género *Pleurotus*.

El género *Pleurotus* puede ser definido como el grupo de hongos que presentan las siguientes características:

- Un píleo o sombrero: o más sombreros agrupados de manera cespitosa ciatiforme e infundibuliforme, a veces en forma de

espátula, pétalo de flor etc. (flabeliforme, concoide o petaloide-espatuliforme) generalmente con simetría bilateral pero no axial.

- Un estípite o pie: excéntrico o lateral aún rudimentario o ausente, frecuentemente provee al extremo base de tricoides en forma de vellosidades miceliales compuestos de pelos rígidos y abundantes.

- Laminillas: longitudinalmente decurrentes sobre la base del pie, con frecuencia anastomosadas transversalmente al nivel de la inserción sobre el pie.

- Hábitat: saprófito lignícola-lignívoro, sobre troncos, ramas o árboles muertos, algunas veces en la tierra sobre raíces podridas.

- Esporada: blanca, crema a gris lila pálido.

- Espora: hialina, lisa, frecuentemente cilíndrica más raramente elipsoide, no amiloide (acianofila).

Cheilocystidios: Frecuentes.

- Trama: hymenophoral e irregular.

- Hifas: cerradas con numerosas asas de anastomosis. Estructura monomitica, pero frecuentemente pseudomonomitica, en los carpóforos maduros.

- Distribución: los hongos del género *Pleurotus* son cosmopolitas, se encuentran en todos los continentes; Europa, Asia; Medio Oriente, América Latina, Africa, Australia etc.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Crecimiento de Basidiomicetos sobre diversas fuentes de carbono y nitrógeno.

Diversas investigaciones se han realizado en el mundo para determinar las diferentes sustancias nitrogenadas y carbonadas asimilables por los Basidiomicetos, obteniendo resultados muy diversos. Entre este grupo de hongos, *Pleurotus ostreatus* se ha estudiado exhaustivamente, por su relativa facilidad de crecimiento e incluso de fructificación.

2.1.1 Asimilación de la fuente de nitrógeno.

LILLY y BARNETT (1951) afirmaron que en el hongo comestible *P. ostreatus*, las sales de amonio, permiten un mejor crecimiento que los aminoácidos.

HACSKAYLO y col. (1954) estudiaron el comportamiento de 25 especies de Basidiomicetos (entre ellos *P. ostreatus*), empleando tres fuentes de nitrógeno: nitrato, amoníaco, y asparagina. Encontrando que todas las especies estudiadas utilizan el nitrógeno orgánico y amoniacal, pero muy lentamente los nitratos.

LEONIAN y LILLY (1938, 1940), STEINBERG (1939), BLOCK y col. (1959), KOCK (1958), TSAO (1963), VOLTZ (1972) indicaron que el crecimiento de *Pleurotus spp.* sobre sales amoniacaes y nitratos es moderado; comparativamente con el manifestado sobre peptona, urea y aminoácidos.

MACAYA-LIZANO (1975) estudió el comportamiento de 25 cepas de *Pleurotus ostreatus* y formas afines, desarrolladas en diferentes fuentes de nitrógeno; ácido aspártico, serina, asparagina, peptona, sulfato de amonio, lisina y nitrato de sodio; observó

que la asparagina se utiliza mejor que el ácido aspártico. En presencia de sulfato de amonio, la velocidad de crecimiento es normal, pero el aspecto del micelio es poco vigoroso y algunas veces se detiene el crecimiento; el crecimiento de estas cepas sobre peptona fue muy favorable.

KHANNA y GARCHA (1985a) estudiaron la producción de biomasa y proteína en medio de cultivo líquido de 4 especies del género *Pleurotus*: *P. ostreatus*, *P. sapidus*, *P. sajor-caju* y *P. florida*, desarrolladas en diferentes fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico; nitrato de amonio, cloruro de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, tartrato de amonio, nitrato de potasio, nitrato de sodio, nitrato de calcio, urea, peptona, asparagina, glicina, ácido L-glutámico y caseína; determinando que el nitrato de potasio es la mejor fuente de nitrógeno inorgánico, excepto para *P. florida*, en cuyo caso la mejor es nitrato de sodio. El nitrato de potasio se ha reportado en otras investigaciones como responsable de una alta producción micelial de *P. sajor-caju* (JANDAİK y KAPOOR, 1976) y *Volvariella volvacea* (GHOSH y SENGUPTA, 1976). El nitrato de amonio o cloruro de amonio; también favorece el crecimiento de *P. ostreatus* y *P. sajor-caju*, sin embargo estos compuestos se han reportado como fuentes de nitrógeno pobres para el crecimiento de *P. flabellatus* (SRIVASTARA y BANO, 1970) y *P. sajor-caju* (JANDAİK y KAPOOR, 1976). Se observó crecimiento mínimo en tartrato de amonio y fosfato de amonio, como también lo reportaron JANDAİK y KAPOOR (1976), sin embargo HASHIMOTO y TAKAHASHI (1974) y KAUL (1977) encontraron que el tartrato de amonio, es la mejor fuente de nitrógeno inorgánica de otros hongos. La peptona origina un máximo crecimiento y producción de proteína de *P. sajor-caju* y *P. ostreatus*; para el desarrollo de *P. sapidus* y *P. florida*, la mayor cantidad de biomasa se produjo con asparagina. Crecimiento mínimo de las especies experimentadas se presenta con el ácido L-glutámico.

MANU-TAWIAN y MARTIN (1988) estudiaron el efecto de fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, en el crecimiento micelial del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo líquido; sintético y de extracto de turba. El fosfato de amonio, fue la mejor fuente de nitrógeno para el medio de cultivo de extracto de turba, y el citrato de amonio la mejor fuente de nitrógeno para el medio de cultivo sintético produciendo la más alta concentración de biomasa 14.7 g/L de micelio seco.

En resumen, estas investigaciones indican la gran variación nutricional de las cepas. La peptona siempre ha sido reportada como la fuente de nitrógeno orgánica, que origina un desarrollo muy elevado en *P. ostreatus* y *P. sajor caju* (HASHIMOTO y TAKAHASHI, 1974; KHANNA y GARCHA 1985a) y de varios hongos más (CHANDRA y PURKAYASTHA, 1977; GOPTA, 1979). El *P. ostreatus* crece sobre sales amoniacaes y nitratos, aún cuando HACSKEYLO y col. (1954) reportaron crecimiento lento sobre nitratos. En medio de cultivo líquido, las especies del género *Pleurotus* se desarrollan mejor sobre nitratos, sales amoniacaes y asparagina (KHANNA y GARCHA, 1985a; JANDAİK y KAPOOR, 1976; MANU-TAWIAN y MARTIN, 1988), en general se aprecian requerimientos nutricionales similares en medio de cultivo sólido y líquido. Por lo que respecta a la asimilación de aminoácidos, algunos autores reportan que el crecimiento de este Basidiomiceto es moderado, (LILLY y BARNETT, 1951); sin embargo diversos experimentos, señalan que es elevado su desarrollo (LEONIAN y LILLY, 1938, 1940; STEINBERG, 1939; BLOCK y col., 1959; KOCK, 1958; TSAO, 1963; VOLTZ, 1972).

2.1.2 Asimilación de la fuente de carbono.

El efecto de las diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento vegetativo de los hongos ha sido mejor estudiado que el efecto del nitrógeno.

Estudios realizados por HSING-HSIUNG y col. (1974) indican que las vías de utilización de la fuente carbonada son las convencionales, puesto que encontraron activas en el extracto de células de micelio de *Agaricus bisporus*, las enzimas de la vía HMP (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, fosfogluconato deshidrogenasa), EMP (glicerofosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa) y del ciclo de Krebs (piruvato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa). La actividad específica de deshidrogenasas se encontró más baja en el micelio, incrementándose en el proceso de fructificación, para posteriormente declinar. En el basidiocarpo, el píleo (sombrero) presenta la mayor concentración de todas las deshidrogenasas. La actividad enzimática a veces fluctúa en el píleo (sombrero) y estípite (pie) de diferentes etapas de crecimiento. Estos autores indican que al parecer la vía HPM tiene un papel importante en la oxidación de la glucosa durante el crecimiento y desarrollo de este Basidiomiceto.

KOCK (1958) y TSAO (1963) observaron en el crecimiento del género *Pleurotus*, que la glucosa, fructosa, manosa y xilosa son buenas fuentes de carbono y el almidón también favorece el crecimiento micelial, (YUSEF y ALLAM, 1967; VOLTZ, 1972). La manosa se ha reportado como la mejor fuente de carbono para el crecimiento de *P. flabelatus* y *P. ostreatus* (SRIVASTARA y BANO, 1970).

JANDAİK y KAPOOR (1976), HASHIMOTO y TAKAHASHI (1974) reportaron que el manitol y sorbitol no son buenas fuentes de carbono para el crecimiento de *P. sajor-caju*, y en medio de cultivo líquido el *P. ostreatus*, no crece en manitol.

GUHA y BANERJEE (1971), CHANDRA y PURKAYASTHA (1977) reportaron al manitol como la mejor fuente de carbono para el crecimiento de *Agaricus campestris* en medio de cultivo líquido.

MACAYA-LIZANO (1975) estudió 25 cepas de *Pleurotus ostreatus* y formas afines, las clasificó en 7 grupos; en base a su velocidad

de crecimiento, aspecto del micelio y fructificación *in vitro*, en diversas fuentes de carbono, (maltosa, sacarosa, almidón, fructosa, glucosa y xilosa) y nitrógeno estudiadas. Indica que todas las cepas manifiestan crecimiento similar en glucosa y fructosa; la xilosa es la pentosa más utilizada, algunas cepas la prefieren en relación a otros azúcares, también crecen las cepas en maltosa y sacarosa. El almidón no es una buena fuente de carbono para algunas de las cepas estudiadas en este trabajo. La fructificación *in vitro* se presenta en los medios de cultivo que contienen como fuente de carbono fructosa, glucosa o sacarosa, y con menos frecuencia en almidón.

KHANNA y GARCHA (1985b) estudiaron la producción de micelio y proteína, en medio de cultivo líquido de 4 especies de *Pleurotus*: *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. sapidus* y *P. ostreatus*, desarrolladas en: dextrosa, fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, lactosa, manosa, sacarosa, sorbitol y manitol. Encontraron que los monosacáridos son los azúcares preferidos por las 4 especies. La eficiencia del cultivo para producir micelio y proteína es mayor para *P. florida*, y *P. ostreatus*, seguida de *P. sajor-caju* y *P. sapidus*. En base a la utilización de azúcares, las 4 especies podrían dividirse en 2 grupos; *P. sajor-caju* y *P. ostreatus*, que prefieren manosa. *P. florida*, y *P. sapidus* prefieren glucosa. La sacarosa fue la siguiente mejor fuente de carbono, para producir micelio y proteína por las 4 especies, seguida por galactosa. La arabinosa es el monosacárido más pobre para el crecimiento de estas especies. El sorbitol y el manitol no son buenas fuentes de carbono para el crecimiento micelial de *P. sajor-caju*, *P. florida*, y *P. ostreatus*, pero si lo son para el crecimiento micelial de *P. sapidus*. Los disacáridos son mejores fuente de carbono para el crecimiento que el sorbitol y el manitol para las especies estudiadas, excepto para el *P. sapidus*.

HADAR y COHEN-ARAZI (1986) determinaron el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo líquido, probando diferentes fuentes de carbono: glucosa, sacarosa, fructosa,

galactosa y lactosa, resultando la glucosa la mejor fuente de carbono para el crecimiento. La concentración óptima de glucosa, fue de 20 g/L, produciendo 11.5 g (peso seco) de biomasa por litro, empleando como fuente de nitrógeno asparagina. En este trabajo también se desarrolló el *P. ostreatus* sobre melaza de betabel, que se encontró como una fuente de carbono factible en el crecimiento, además de su bajo costo; produciendo a una concentración óptima de 25 g/L, 7.5 g (peso seco) de biomasa por litro.

En general la mejor fuente de carbono asimilable para el *P. ostreatus*, es la glucosa, mientras que en fructosa, manosa y xilosa también se favorece el crecimiento micelial, (KOCK, 1958; TSAO, 1963; MACAYA-LIZANO, 1975; KHANNA y GARCHA, 1985b; HADAR y COHEN-ARAZI, 1986). El crecimiento de este hongo en almidón es moderado, de las fuentes de carbono experimentadas el *Pleurotus ostreatus* se desarrolla menos en manitol y sorbitol (JANDAİK y KAPOOR, 1976; HASHIMOTO y TAKAHASHI, 1974).

De las investigaciones realizadas en Basidiomicetos sobre asimilación de fuente de carbono y nitrógeno, se concluye que existe una gran variabilidad de comportamiento aún entre cepas de la misma especie, lo que hace muy difícil inferir el comportamiento dada la individualidad manifestada en las cepas.

2.2 Morfogénesis en Basidiomicetos.

La morfogénesis es el desarrollo de la forma y estructura de un organismo (MOORE, 1993), la morfogénesis del cuerpo fructífero es un proceso complejo que implica un análisis genético y bioquímico. En Basidiomicetos se han estudiado principalmente dos géneros *Schizophyllum* y *Coprinus* (SCHWALB, 1978; GOODAY, 1975; MOORE, 1981).

En relación a la genética del control de la fructificación, uno de los problemas más importantes es la incompatibilidad de factores. Aun cuando en una diversa selección de Agaricales y Poliporales se ha reportado la fructificación en micelio monocariótico (STAHL y ESSER, 1977) lo que permite en principio realizar un control genético del desarrollo del cuerpo fructífero (MOORE, 1994). Indiscutiblemente la formación del dicarion es la base para la iniciación de la fructificación (STAHL y ESSER, 1977; SCHWALB, 1978).

MOORE (1993) indica que en Basidiomicetos es muy difícil realizar estudios sobre la genética de desarrollo por medios convencionales. Una razón, es que sus cuerpos fructíferos son formados normalmente por micelio heterocariótico, lo que implica la presencia de dos o más núcleos y por consecuencia dos o más genotipos.

RAPER y KONGELB (1958) analizaron la fructificación en un gran número de dicariones. Reportan que las técnicas para optimizar la fructificación no son conocidas. Concluyen que la habilidad para fructificar es una característica genéticamente compleja y que algunas cepas son genéticamente pobres para fructificar. Indican que cada génoma haploide produce únicamente la mitad del total de las proteínas de regulación requeridas para el control de la fructificación.

RAPER y KONGELB (1958), y RAPER (1966) demostraron que existe un sistema complejo genético, que controla la formación del relativamente simple basidiocarpo de *Schizophyllum comune*, pero WESSELS y col. (1965) demuestran que en su fructificación también intervienen cambios bioquímicos.

Para examinar los procesos de regulación con los cuales se controla la fructificación es necesario determinar algunos de los cambios bioquímicos asociados con la morfogénesis. Estos cambios

sirven como marcadores del proceso de desarrollo independientemente de la morfología (SCHWALB, 1978).

GOODAY (1975) reportó que la formación y desarrollo de cuerpos fructíferos de especies del género *Coprinus*, como con otros sistemas de diferenciación es controlada por una serie de mecanismos. El control de la genética primaria ha sido demostrado con estudios de cuerpos fructíferos anormales de *Coprinus macrorhizus* (KIMURA y FUGIO, 1961), por TAKEMARU y KAMADA (1969, 1970, 1972) y TAKEMARU y col. (1974), quienes obtuvieron desarrollo de mutantes de esta especie tales como algunas que producen "poca elongación" o "poca expansión" de los cuerpos fructíferos.

Diversos estudios en mutantes del género *Coprinus* muestran que la elongación del estípite y expansión del píleo son eventos controlados independientemente (GOODAY, 1974), TAKEMARU y col. (1974). A veces el desarrollo del estípite depende de la presencia del píleo durante la fase más temprana de formación del cuerpo fructífero de *Coprinus cinereus* (BORRISS, 1934; EILERS, 1974). Otros hongos tales como *Agaricus bisporus*, muestran tal interdependencia por un tiempo mayor durante la maduración del cuerpo fructífero (HAGIMOTO, 1964; HAGIMOTO y KONICHI 1959).

La fase de rápida elongación del estípite en *Coprinus* esta precedida por un decremento en el contenido de glucógeno, incremento en el contenido de AMP, incremento en el número de núcleos por célula (LU, 1974; MOORE y col., 1979a, STEPHENSON y GOODAY, 1984), y una etapa de interdependencia con el desarrollo del píleo. Es un proceso endotrópico autónomo, por no requerir la presencia de nutrientes exógenos, agua o píleo (sombrero); ello involucra la elongación de células (KAMADA y TAKEMARU, 1983; HAMMAD y col., 1993), un incremento en actividad de quitinsintetasa y un incremento en el contenido de quitina a expensas de otros constituyentes celulares, con la inserción de nuevas microfibrillas de quitina entre la microfibrillas

transversas existentes (GOODAY, 1975). El proceso de elongación y la inserción necesaria de nuevos materiales de la pared celular, implica un balance controlado entre la síntesis y lisis. Se han detectado actividades quitinolíticas y proteolíticas en extracto de células libres de estípite (GOODAY, 1975). La quitinsintetasa es activada alostericamente por su sustrato, UDP-N-acetilglucosamina, y también por N-acetilglucosamina (DE ROUSSET-HALL y COODAY, 1975; GLASER y BROWN, 1957; RUIZ-HERRERA, 1982; RUIZ-HERRERA y col., 1992). La N-acetilglucosamina es un azúcar no común en estado libre, pero se forma de la ruptura de la quitina. DE ROUSSET-HALL y GOODAY (1975), reportan que la glucosamina, un análogo tóxico de la glucosa, a bajas concentraciones es un activador alostérico de la quitinsintetasa.

Estudios de GOODAY (1972) y CRAIG y col. (1981) en *Coprinus cinereus* y *Agaricus bisporus* respectivamente, demuestran que la síntesis de quitina ((1-4)- β -homopolimero de N-acetilglucosamina; MOORE, 1981), es esencial para la elongación de la pared de la hifa del estípite. El precursor de la quitina es N-acetilglucosamina y es incorporado en la elongación de la hifa de cuerpos fructíferos que se encuentran expandiéndose (WESSELS y col., 1990). La actividad de la enzima quitinsintetasa se incrementa durante la rápida expansión del estípite del cuerpo fructífero de *Coprinus cinereus* (GOODAY, 1972 y 1973) y *Agaricus bisporus* (CRAIG y col., 1981) y decrece al final del periodo de elongación.

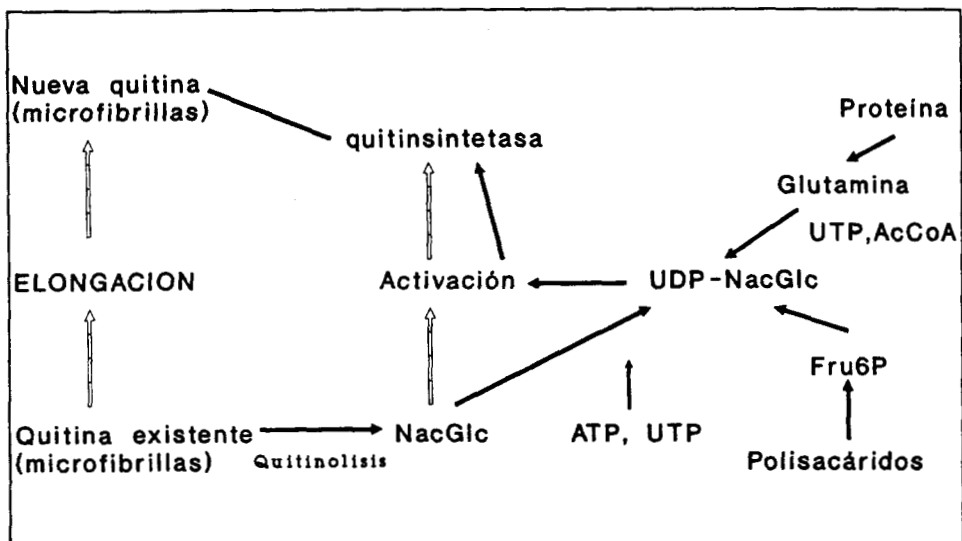


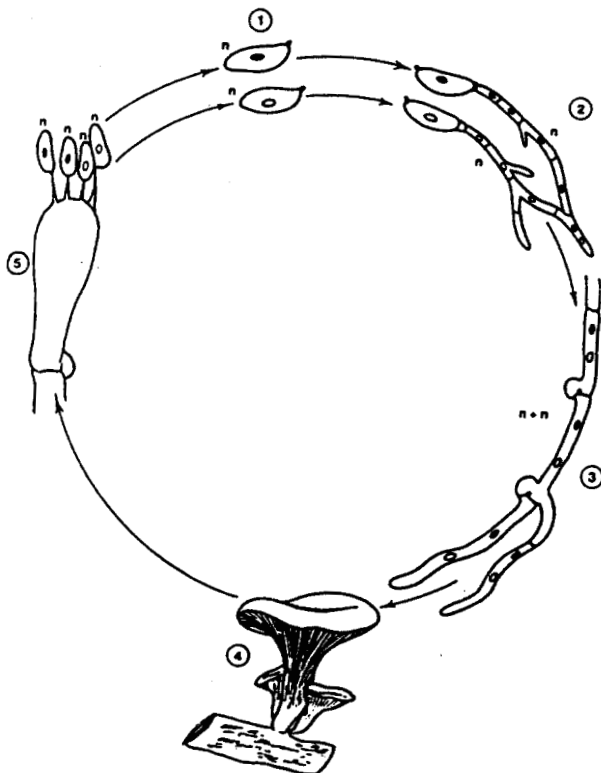
FIGURA 1. MECANISMO PROPUESTO EN LA INTERACCION METABOLICA DE LA SINTESIS DE NUEVAS MICROFIBRILLAS DE QUITINA DURANTE LA ELONGACION DE CELULAS DEL ESTIPITE DE *Coprinus cinereus*. NacGlc: N-acetilglucosamina; UDP-NacGlc: UDP-N-acetilglucosamina; Fru6P: fructosa-6-fosfato; AcCoA: acetilCoA. (GOODAY, 1975).

ISHIKAWA y UNO (1977) reportan que en *Coprinus macrorhizus* o *cinereus*, el AMPc actúa como sustancia inductora de la fructificación y únicamente se acumula durante este proceso. Puede evitar la represión catabólica debida a alta concentración de glucosa e inducir las enzimas que actúan en la fructificación, adenilciclase y AMP ciclicofosfodiesterasa y 3 clases de proteinquinasa. La habilidad de incrementar el nivel de AMPc, parece ser factor importante para inducir el cuerpo fructífero en *Coprinus*, sin embargo en *S. comune* no se encontró evidencia de que el AMPc o algún derivado de éste actuara como inductor de la fructificación (SCHWALB, 1978). Algunas veces se observó que el AMPc podría afectar profundamente la morfología de desarrollo de cuerpos fructíferos (SCHWALB, 1974); a una concentración de 10^{-3} M en medio normal de fructificación, el AMPc causa la formación

de pequeños cuerpos fructíferos y cuerpos fructíferos sin laminillas, en cepas silvestres de esta especie.

Los primordios, resultado de la fructificación, se pueden apreciar como cuerpos discretos en el micelio vegetativo dicariótico desarrollados por la diferenciación del píleo y el estípite, cariogamia, meiosis y desarrollo de la basidiospora (FIG. 2). El resultante cuerpo fructífero inmaduro sufre un incremento rápido en la longitud; se elonga el estípite y se expande el píleo. Finalmente las basidiosporas maduras se liberan y el tejido de las laminillas se autólisis. Esta secuencia en el desarrollo parece ser común en muchas cepas diferentes y especies de *Coprinus*; pero por supuesto hay diferencias relativas en la dinámica y tamaño de cada etapa (GOODAY, 1975).

En relación a los estudios sobre fructificación KOCK (1958), y BLOCK y col. (1959), indican que obtienen carpóforos de *Pleurotus ostreatus* utilizando, como fuentes de nitrógeno; peptona, hidrolizado de caseína, nitrato de sodio y sulfato de amonio, y como fuentes de carbono melaza, glucosa o celulosa. KLIUSHNIKOV y col. (1935) observaron que el almidón es un nutriente desfavorable para la fructificación.



1. Basidiosporas uninucleadas.
2. Germinación de la basidiospora y fusión de dos micelios primarios compatibles (intercambio de núcleos).
3. Micelio secundario dicariótico (dicarión), fructífero con asas de anastomosis.
4. Carpóforo o basidiocarpo.
5. Basidio con cuatro basidiosporas conteniendo cada uno de los núcleos haploides resultantes de la meiosis.

FIGURA 2. CICLO DE REPRODUCCION DEL GENERO *Pleurotus* (OLIVIER Y DELMAS, 1987).

2.3 Efecto de la 2-desoxiglucosa en Basidiomicetos y otros hongos.

La 2-desoxiglucosa es un análogo tóxico de la glucosa que causa inhibición del crecimiento de algunos hongos por emplearse en su metabolismo en lugar de la glucosa; este azúcar es metabolizado por varias especies pero en general sólo una fracción pequeña se utiliza (MOORE, 1981).

MOORE (1981) realizó investigaciones sobre el efecto de la 2-desoxiglucosa, en el crecimiento de Basidiomicetos específicamente del género *Coprinus*. Reporta que la hexoquinasa, fosforilasa de la 2-desoxiglucosa y 2-desoxiglucosa 6-fosfato, inhiben la actividad de la fosfohexosa isomerasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, inhibiendo el consumo y fosforilación de azúcares fácilmente metabolizables. La inhibición en el consumo de glucosa no es el único factor para la inhibición del crecimiento de los hongos.

La formación de la 2-desoxiglucosa 6-fosfato, es el límite del metabolismo de este análogo de la glucosa, la acumulación del éster de fosfato, origina un consumo considerable de las reservas de fosfato y el nivel de ATP baja drásticamente. Inmediatamente la 2-desoxiglucosa promueve la degradación de nucleótidos de purina y pueden llegar al mínimo nivel de hipoxantina. El material preelaborado de la pared es degradado e impedida la síntesis de nuevos componentes de la pared, debido a la reacción de la 2-desoxiglucosa con los nucleótidos de uridina y guanosina. La interferencia de la 2-desoxiglucosa con la estructura de la pared reduce notablemente la estabilidad osmótica, y la lisis celular es el factor principal de inhibición del crecimiento por 2-desoxiglucosa 6-fosfato en levaduras, y en hongos filamentosos es semejante. ZONNEVELD (1973) reportó que la 2-desoxiglucosa inhibe la formación de glucano en *Aspergillus nidulans*. MOORE y STEWART (1972), indicaron que ocurre una lisis de células de la

punta de la hifa durante el crecimiento de *Coprinus cinereus* en presencia de este análogo de la glucosa.

MOORE (1981), ALLEN y col. (1989) reportaron que las cepas mutantes que son resistentes a 2-desoxiglucosa 6-fosfato, presentan alteraciones en el sistema de transporte, o en funciones de la hexoquinasa o fosfatasa. MARTIN y HEREDIA (1977), HEREDIA y col. (1964), HEREDIA y SOLS (1964), caracterizaron y purificaron una fosfatasa que evita la acumulación de 2-desoxiglucosa 6-fosfato, en cepas de levaduras mutantes; resistentes a 2-desoxiglucosa. TAJ-ALDEEN y MOORE (1983), indican que las cepas mutantes de *Coprinus* normalmente presentan una actividad inalterada de hexoquinasa.

Muchos aspectos sobre el metabolismo de los carbohidratos requieren de investigación y para tales estudios, los análogos tóxicos de la glucosa tienen mucho que ofrecer. Es muy importante el empleo de los análogos tóxicos de la glucosa para estudios de morfogénesis de la hifa, especialmente en la conexión entre la construcción de la pared y la morfología. Diferentes estudios indican que usando los análogos tóxicos de la glucosa se inducen cambios paramórficos, (factores capaces de inducir cambios morfológicos reversibles sin alterar el génoma) y alteraciones genéticas que pueden imponer anomalías morfológicas, lo cual ha contribuido a la generalización que los cambios morfológicos ocurren cuando el balance entre los componentes o precursores de la pared son alterados (GOODAY, 1975). Contradictoriamente en el crecimiento anormal de la hifa causada por los análogos de glucosa, pueden encontrarse células normales de la hifa las que forman los tejidos de las estructuras complejas de los hongos tales como el carpóforo en los Basidiomicetos (MOORE, 1981).

2.4 Empleo de la técnica del análisis de imágenes para el estudio de hongos.

El término análisis de imágenes es usualmente empleado para procedimientos computarizados y se define como la captura de una imagen, seguida por la cuantificación y clasificación de componentes dentro de ésta (VAN DE VOOREN y col., 1991).

El procesamiento digital de imágenes, para el estudio de micelios de hongos, es una metodología desarrollada recientemente, y estudiada por varios autores; siendo una técnica muy promisoría (PACKER y THOMAS, 1990; GONZALEZ-BLANCO y col., 1993; LARRALDE y col., 1994), puesto que se completa la información química con la morfológica (LARRALDE-CORONA, 1992). El análisis de imágenes puede superar a la técnica manual, facilitando el procesamiento de grandes cantidades de material en un tiempo relativamente corto (BAUM y BAILEY, 1987).

En Basidiomicetos se han realizado estudios empleando imágenes digitalizadas para la clasificación de variedades (VAN DE VOOREN, y col.; 1991) e identificación de hongos cultivables, específicamente *Agaricus bisporus* (VAN DE VOOREN y col., 1992). Se desarrolló un modelo para distinguir varios hongos cultivables en base a sus caracteres morfológicos y fisiológicos. Diferenciando variedades de *Agaricus bisporus* híbridas; blanco y crema, con pequeñas diferencias morfológicas entre sí y muy poca variación genética (VAN DER NEUT, 1991). Una simple medición manual y observación de los hongos, son pruebas insuficientes para diferenciarlos entre sí, empleándose con buenos resultados el análisis de imágenes junto con el modelo de reconocimiento.

VAN DE VOOREN y col. (1991) reportaron que es posible diferenciar el 80% de los hongos cultivables experimentados a 1% de nivel de significancia, usando únicamente 4 caracteres; área, factor de forma y excentricidad del pileo y factor de forma de las

laminillas, de las 44 caracteres probados (VAN DE VOOREN y col., 1992), siendo el método de análisis de imágenes más rápido y más preciso que el método manual y visual usados comunmente. En este trabajo se presenta un estudio morfométrico de la fase micelial de *Pleurotus ostreatus*, desarrollado en diferentes medios de cultivo.

3. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar una metodología de caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus*, mediante la evaluación de la fisiología y morfometría de crecimiento de su fase micelial, en medio de cultivo sólido, empleando como agente selectivo la 2-desoxiglucosa (2-DG).

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

3.2.1 Evaluar el efecto de la 2-DG en el crecimiento de diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus*.

3.2.2. Evaluar el efecto de interacción de la 2-DG, con almidón y glucosa empleados como fuente de carbono, en el crecimiento de la fase micelial de *Pleurotus ostreatus*.

3.2.3 Desarrollar un método morfométrico para determinar el crecimiento del micelio vegetativo de *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo sólido, con diferentes concentraciones de 2-desoxiglucosa.

3.2.4 Proponer una metodología a nivel laboratorio que permita inferir el comportamiento de las cepas de *Pleurotus ostreatus* a nivel de planta productora.

4. HIPOTESIS.

4.1 El crecimiento micelial de las cepas de *Pleurotus ostreatus* en diferentes medios de cultivo conteniendo 2-desoxiglucosa, dependerá de su resistencia o sensibilidad a este tóxico; las cepas resistentes serán las de metabolismo más acelerado.

4.2 El crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* será favorable en polímeros de glucosa, como el almidón; ya que su hábitat natural son sustratos lignocelulósicos, pero más lento que en glucosa por ser ésta de más fácil asimilación para el hongo.

4.3 Durante el crecimiento de la fase micelial de *P. ostreatus*, en diferentes medios de cultivo se manifestaran características morfológicas; cuantitativas y cualitativas que permitirán diferenciar a las cepas entre sí.

4.4 Las cepas de *Pleurotus ostreatus* no sujetas a represión catabólica (o de metabolismo acelerado), serán las cepas que mejor se desarrollen a nivel de cultivo, ya que los sustratos lignocelulósicos son ricos en diversos azúcares.

5. METODOLOGIA.

5.1 Cepas de *Pleurotus ostreatus*.

Se estudiaron seis cepas de *Pleurotus ostreatus*, tres del cepario del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (C.I.C.B-U.A.T.), UAT-PO3, UAT-PO4 y UAT-PO7; y tres cepas de colección, de la American Type Culture Collection (A.T.C.C.), ATCC-32783, ATCC-38537 y ATCC-58052. En la TABLA II se describen algunas características de éstas.

TABLA II. Característica de las cepas experimentadas.

CEPA	CARACTERISTICAS
UAT-PO7	Basidiocarpo de color crema oscuro (FIG. 22), desarrollo micelial en el sustrato abundante. (Cepa originaria de Praga).
UAT-PO4	Basidiocarpo de color café claro (FIG. 23), invasión micelial en el sustrato abundante. (Cepa originaria de U.S.A.).
ATCC-38537	Basidiocarpo de color crema oscuro (FIG. 24), desarrollo micelial en el sustrato poco abundante. Reportada como "formación de primordio" (catálogo de la ATCC, 1991).
UAT-PO3	Basidiocarpo de color café claro (FIG. 25), desarrollo micelial en el sustrato abundante. (Cepa aislada del volcán Popocatepetl).
ATCC-58052	Basidiocarpo de color blanco ostión (FIG. 26) desarrollo micelial en el sustrato muy abundante. Reportada como "degradación de ligninocelulosa" (catálogo de la ATCC, 1991).
ATCC-32783	Basidiocarpo de color café claro (FIG. 27), desarrollo micelial en el sustrato muy abundante. Reportada como "degradación de lignina" (catálogo de la ATCC, 1991).

5.2 Propagación de la fase micelial y obtención del inóculo.

Cada una de las cepas se desarrolló en medio de cultivo sólido Czapek-Dox, se incubó a 25 °C durante 7 días, tiempo en el cual se tomó el inóculo del contorno de la colonia, empleando un horador de 4.4 mm de diámetro. Estos cultivos se usaron para sembrar (en el centro) cada una de las cajas Petri conteniendo los diferentes medios de cultivo a experimentar.

5.3 Medios de cultivo.

Se emplearon 8 medios de cultivo sólidos, con la composición especificada en la siguiente tabla.

TABLA III. Composición de los medios de cultivo empleados.

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICION (g/L)
M1	ALMIDON (10.5)
M2	ALMIDON (10.5) + 2-DESOXIGLUCOSA (0.01)
M3	ALMIDON (10.5) + 2-DESOXIGLUCOSA (0.1)
M4	ALMIDON (10.5) + 2-DESOXIGLUCOSA (1.0)
M5	GLUCOSA (10.63)
M6	GLUCOSA (10.63) + 2-DESOXIGLUCOSA (0.01)
M7	GLUCOSA (10.63) + 2-DESOXIGLUCOSA (0.1)
M8	GLUCOSA (10.63) + 2-DESOXIGLUCOSA (1.0)

Contienen además 17 g/L de bacto-agar, 1.0 g/L de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, en una relación C/N de aproximadamente 20; y un medio de cultivo mineral base con la siguiente composición en gramos por litro: KH_2PO_4 , 0.5; $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02; (medio mineral base modificado de

MACAYA-LIZANO, 1975; y EGER, 1978). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 6.5, empleándose una solución de KOH al 30%.

5.4 Equipo experimental.

Los experimentos se realizaron por triplicado en cajas de Petri de 9 cm de diámetro y 1.5 cm de altura, conteniendo cada uno de los medios de cultivo.

5.5 Estudios realizados.

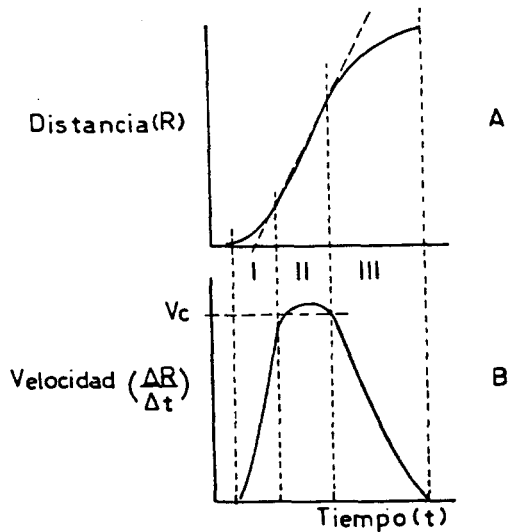
Las cepas UAT-PO3, UAT-PO4 y UAT-PO7 se experimentaron a temperaturas de 25 °C, 28 °C y 30 °C y las cepas ATCC-32783, ATCC-38537 y ATCC-58052 a 25 °C, realizándose los siguientes estudios.

5.5.1 Velocidad de crecimiento radial (u_r).

Una vez inoculadas las cajas de Petri con los diferentes medios de cultivo e incubadas a 25 °C, se midió el avance del micelio vegetativo durante 6 días ; puesto que la caja de Petri es invadida completamente por algunas cepas fundamentalmente en los medios M1 , M5 y M6, al día 7 de desarrollo.

5.5.1.1 Fundamentos teóricos para el cálculo de la velocidad de crecimiento radial (u_r).

Se determinó la velocidad de crecimiento radial (u_r), de acuerdo al siguiente análisis teórico.



I Fase de aceleración.

II Fase de velocidad de crecimiento constante.

III Fase de desaceleración.

A Curva integral de crecimiento, $R = f(t)$.

B Curva derivada de crecimiento, $u_r = \frac{R}{t} = g(t)$.

FIGURA 3. Curvas ideales que representan la velocidad de crecimiento (MANDELS, 1965; JOLY y Col., 1971; MACAYA-LIZANO, 1975).

$$u_r = \Delta R / \Delta T = f(t) \quad (1)$$

$$Y = mx + b \quad \text{aproximación de la fase II de crecimiento,} \quad (2)$$

$$Y = R, \quad X = t; \quad \text{ordenada y abcisa en la recta,} \quad (3)$$

$R = mt + b$; sustituyendo (3) en (2)

$m = R/t$ recta que pasa por el origen (4)

$u_r = \Delta R / \Delta t = m$ de (4) en (1) (5)

5.5.2 Diámetro de la hifa distal (D_{hd}) y longitud de la hifa distal (L_{hd}).

Se midió el diámetro y la longitud de la hifa distal de cada una de las cepas experimentadas en los diferentes medios de cultivo, realizando 30 mediciones para cada una alrededor de la colonia, a los 6 días de desarrollo, empleando cuando fue necesario solución fijadora (formaldehído al 40%, 13 mL; ácido acético glacial, 5 mL y etanol al 50%, 200 mL) para detener el crecimiento (PACKER Y THOMAS, 1990) y azul de anilina para teñir las hifas y facilitar la medición.

5.5.3 Evaluación de velocidad de crecimiento específica (μ_{cal}).

Con los datos obtenidos de la velocidad de crecimiento radial (u_r), diámetro (D_{hd}) y longitud de la hifa distal (L_{hd}), se evaluó la tasa específica de crecimiento (μ_{cal}), para cada cepa en cada uno de los medios de cultivo experimentados.

5.5.3.1 Fundamentos teóricos para el cálculo de la velocidad de crecimiento específica (μ_{cal}).

BARTNICKI-GARCIA y col., (1989) reportan que los micelios de los hongos generalmente crecen por las puntas o zona apical, con diámetro uniforme. Su crecimiento ha sido atribuido a un fenómeno complejo en el que participan las vesículas (agregado de enzimas hidrolíticas y sintéticas que degradan y reelaboran fragmentos de pared celular), que son distribuidas en forma radial y aleatoria

hacia la pared apical dando lugar a un crecimiento de la superficie con una velocidad Q_a que es proporcional al producto de la velocidad de elongación dL/dt , por el diámetro, D .

$$Q_a = 2\pi D_{hd}(dL/dt) \quad (1)$$

La elongación de las hifas sigue una ecuación exponencial, es decir su velocidad es proporcional a su longitud, de donde;

$$dL/dt = KL \quad (2)$$

Esta ecuación fue propuesta por SMITH, (1924) y se ha corroborado experimentalmente por diversos autores TRINCI (1969), TRINCI (1974), y LARRALDE y col. (1994). La ecuación (2) implica que la síntesis de vesículas a través del sustrato se lleva a cabo en forma relativamente homogénea a lo largo del segmento subapical y que la velocidad de síntesis de la pared Q_a no se encuentra saturada por vesículas hasta que el micelio se ramifica, la solución de la ecuación es;

$$L = L_0 e^{kt} \quad (3)$$

Luego entonces se tendría que dL/dt alcanzaría un valor máximo, u_r si al tiempo crítico de ramificación (t_c), $L = L_{max}$, como se indica en la siguiente ecuación;

$$u_r = kL_{max} = L_0 e^{k t_c} \quad (4)$$

Por lo tanto la frecuencia promedio de ramificación ϕ , estará dada por;

$$\phi = 1/t = k/\ln(L_{max}/L_0) = (u_r/L_{max})/\ln(L_{max}/L_0) \quad (5)$$

El valor estimado de L_0 por ajuste de las curvas exponenciales de elongación (3), es aproximadamente el doble de, D_{hd} (VINIEGRA-GONZALEZ y col. (1993a).

VINIEGRA-GONZALEZ y col. (1993b) reportan que el balance de materiales de una hifa, permite establecer la cantidad de biomasa, X , como proporcional al número de hifas = $(2N_t - 1)$, N_t es el número de puntas. Esto si se toma en cuenta que; la biomasa de cada hifa es proporcional al área de sección ($\pi D^2/4$), a su longitud promedio L_{av} , a la proporción de sólidos $(1-W)$ y a su densidad ρ como se muestra en la siguiente ecuación;

$$X = (2N_t - 1)(1-W)\rho(\pi D_{hd}^2/4)L_{av} \quad (6)$$

El máximo de la función densidad de probabilidad se alcanza cuando $L = L_{av}$, por lo tanto, si el número de las hifas se duplica cada t_c horas, la proporción de biomasa sobre la biomasa original (X/X_0) será una función exponencial del tiempo, según se ha demostrado (VINIEGRA-GONZALEZ y col., (1993b), y se define en la ecuación;

$$(X/X_0) = 2^{t/t_c} = e^{(\mu_{exp})t} \quad (7)$$

μ_{exp} , es la velocidad específica de crecimiento, indicada en la ecuación usual exponencial;

$$dx/dt = \mu_{exp}X \quad (8)$$

El parámetro μ_{exp} puede ser estimado como la pendiente de la gráfica $\ln X$ vs t o mediante el ajuste de la ecuación logística;

$$X = X_{max}/[1 + Ae^{-(\mu_{log})t}] \quad (9)$$

Donde $A = (X_{max} - X_0)/X_0$ es una constante que depende de las condiciones iniciales del cultivo (X_0) y μ_{log} es la constante cinética de la ecuación logística.

Ya que $\mu_{exp} \approx \mu_{log}/2$, pues la evaluación del parámetro según la ecuación (7), se hace cuando $X \approx X_{max}/2$.

$$\frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \mu_{\log} [1 - (x/x_{\max})] \quad (10)$$

$$\text{si } x = x_{\max}/2; \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \mu_{\log}(0.5) = \mu_{\exp} \quad (11)$$

Para estimar el valor de μ_{cal} en términos de los valores de L_{av} , D , y u_{r} se puede recurrir a las ecuaciones definidas anteriormente, quedando;

$$\mu_{\text{cal}} = (\ln 2)\phi = (\ln 2)u_{\text{r}}/[BL_{\text{av}}\ln(BL_{\text{av}}/2D)] \quad (12)$$

Esta ecuación tiene un parámetro libre de ajuste β , que representa la constante de proporcionalidad entre L_{max} y L_{av} , definida de la siguiente manera;

$$L_{\text{max}} = \beta L_{\text{av}} \quad (13)$$

El ajuste del parámetro β se lleva a cabo mediante la minimización de la función χ^2 entre μ_{cal} y μ_{\log} . De investigaciones anteriores (LARRALDE y col., 1994), se conoce $\beta = 2.414$. Con lo que se puede determinar el valor de μ_{cal} .

5.5.4 Consumo de glucosa y cuantificación de biomasa.

Se cuantificó la cantidad de glucosa consumida, (en cajas de Petri con 20 mL de medio de cultivo), para cada una de las cepas experimentadas a los 5 y 10 días de desarrollo, en los medios de cultivo conteniendo como fuente de carbono glucosa y diferentes concentraciones de 2-DG. El medio de cultivo se desprendió de la caja Petri, empleando una espátula, se colocó en un vaso de precipitado conteniendo 180 mL de agua destilada, se tapó y se fundió en un horno de microondas (KENMORE, MOD. 720) durante 3 min, separando el micelio con unas pinzas. El micelio se secó durante 24 horas a 65 °C y se pesó, en el medio de cultivo se

cuantificó el consumo de glucosa empleando el método de DNS (preparación del reactivo DNS: ácido 3,5 dinitrosalicílico, 1 g; hidróxido de sodio, 1 g.; sulfito de sodio anhidro, 0.05 g; fenol, 0.20 g.; y agua destilada 200 mL), reportado por MILLER (1959), previamente se realizó una curva patrón. Este experimento se efectuó por duplicado para el caso de la producción de biomasa y para evaluar el consumo de glucosa por triplicado para cada caja de Petri desarrollada.

5.5.5 Evaluación del factor de rendimiento ($Y_{X/S}$) en caja de Petri.

Con los datos obtenidos del consumo de glucosa y producción de biomasa, se realizó el cálculo del factor de rendimiento ($Y_{X/S}$) en cada una de las cepas probadas para los medios de cultivo ya indicados, (M5, M6, M7, y M8).

5.5.5.1 Fundamentos teóricos para el cálculo del factor de rendimiento ($Y_{X/S}$).

El factor de rendimiento del crecimiento ($Y_{X/S}$), es un parámetro cuantitativo que indica como se esta aprovechando un sustrato; se define como la razón entre el incremento de biomasa (ΔX) y el consumo de sustrato observado (ΔS) (PIRT, 1975), se expresa de la siguiente manera, cuando el límite de dS tiende a cero;

$$Y = - \frac{dX}{dS} \quad (1)$$

Al mantener las condiciones del medio constantes, el coeficiente de rendimiento también es constante y reproducible, calculandose Y por;

$$X - X_0 = Y (S_0 - S) \quad (2)$$

De dónde se puede calcular el factor de rendimiento, en base a la biomasa en este caso producida en caja Petri conteniendo 20 mL de medio de cultivo, determinada por peso seco y el consumo de glucosa efectuado por el hongo en estas condiciones (despreciando la cantidad de biomasa presente en el inóculo inicial).

5.5.6 Empleo de la técnica del procesamiento digital de imágenes.

Para determinar la velocidad de crecimiento radial (u_r), el diámetro (D_{hd}) y longitud de la hifa distal (L_{hd}), se empleó la técnica del procesamiento digital de imágenes, mediante el uso del programa IMAGENIA (BIOCOM, FRANCIA), provisto de una tarjeta digitalizadora Matrox y empleando una computadora HP QS/20 provista de un coprocesador 386.

En el caso de la velocidad de crecimiento radial (u_r), se marcaba el avance del crecimiento micelial, para posteriormente medirlo en el procesador de imágenes. Para medir el diámetro (D_{hd}) y longitud de la hifa distal (L_{hd}), se tomaba del contorno de la colonia una parte de agar, y se colocaba en un portaobjetos para determinar sus dimensiones. Ocasionalmente se empleó una solución fijadora para detener el crecimiento micelial, y solución para teñir las hifas y facilitar la medición.

5.5.7 Comportamiento de las cepas en planta productora.

Se evaluó el comportamiento en cultivo de cada una de las cepas, en la Empresa Biotecnología Agropecuaria S.A. de C.V., en Apizaco, Tlaxcala. Se procesaron 300 Kg de sustrato, paja de trigo, sembrándose 10 fermentadores de 5 Kg de sustrato para cada cepa. Se determinaron los siguientes parámetros; tiempo de fructificación, primera, segunda y tercera cosecha, % de eficiencia biológica (cantidad de hongo fresco producido entre sustrato seco empleado para la producción del hongo por 100) y productividad (Kg de hongo fresco producido entre tonelada de sustrato seco empleado por día).

5.5.8 Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus*, desarrollado en medios de cultivo conteniendo 2-desoxiglucosa.

Las cepas UAT-PO3, UAT-PO4 y UAT-PO7, se crecieron en los diferentes medios de cultivo (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 y M8), a 28 °C y 30 °C además del estudio realizado a 25 °C, evaluandose en todos los casos; la velocidad de crecimiento radial (u_r), diámetro de la hifa distal (D_{hd}), longitud de hifa distal (L_{hd}), y tasa de crecimiento específica (μ_{cal}), según métodos especificados anteriormente.

5.6 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA), en base a los datos del ANOVA se realizaron las pruebas de significancia de las diferencias, o las comparaciones entre las medias de las muestras por medio de la prueba de Rango Múltiple de Duncan, empleando el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System).

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Se presentan los resultados obtenidos del estudio, de las cepas de *Pleurotus ostreatus*, UAT-PO3, UAT-PO4, UAT-PO7, ATCC-32783, ATCC-38537 y ATCC-58052, a nivel laboratorio a 25 °C; en diferentes medios de cultivo, sobre: velocidad de crecimiento radial (u_r), diámetro de la hifa distal (D_{hd}), longitud de la hifa distal (L_{hd}), tasa específica de crecimiento (μ_{cal}), consumo de glucosa, producción de biomasa y factor de rendimiento en caja Petri ($Y_{x/s}$); así como tiempo de fructificación (tf), % de eficiencia biológica (% E.B.), y productividad (PR), parámetros evaluados a nivel de Planta productora.

Además se presentan los resultados del comportamiento de las cepas, UAT-PO3, UAT-PO4 y UAT-PO7, a nivel laboratorio a 28 °C y 30 °C en diferentes medios de cultivo, sobre: velocidad de crecimiento radial (u_r), diámetro de la hifa distal (D_{hd}), longitud de la hifa distal (L_{hd}) y tasa específica de crecimiento (μ_{cal}).

También se muestran algunas impresiones de imágenes digitalizadas de hifas en las FIGURAS 12-19.

6.1 Velocidad de crecimiento radial (u_r).

Para todas las cepas experimentadas, la velocidad de crecimiento radial (u_r) manifestada en el medio de cultivo que contenía como fuente de carbono almidón (M1), fue mayor que la velocidad de crecimiento radial en el medio de cultivo que contenía glucosa como fuente de carbono (M5), como se observa en la TABLA IV y en la FIGURA 4. Estas diferencias fueron observadas en todas las cepas y aunque no fueron estadísticamente significativas, sugieren una tendencia fisiológica de los micelios a extenderse más rápidamente en un sustrato cuya fuente de carbono es compleja (almidón), que cuando se trata de glucosa; esto es probablemente debido a que el hábitat natural del *Pleurotus ostreatus* son polímeros de glucosa, se

ha reportado que la degradación de lignina se efectúa por medio de un proceso de metabolismo secundario que requiere para su degradación la presencia de ciertas enzimas producidas vía el crecimiento inicial del hongo en azúcares simples (BOOMINATHAN y ADINARAYANA, 1992), por lo que una vez que se han producido enzimas para el ataque de polímeros de glucosa su crecimiento en este sustrato (almidón), es más rápido. Las cepas que presentaron mayor velocidad de crecimiento radial en estos medios de cultivo (M1 y M5), fueron las cepas UAT-PO4; UAT-PO7 y ATCC-38537.

TABLA IV. EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO RADIAL (u_r [=] $\mu\text{m/hr}$) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, A 25 °C.

MEDIO DE CULTIVO	CEPA UTILIZADA					
	UAT PO7	UAT PO4	ATCC 38537	UAT PO3	ATCC 58052	ATCC 32783
ALMIDON						
M1	310.40 ±11.62	319.65 ± 7.55	284.85 ± 8.85	267.73 ±14.33	277.15 ±13.67	280.00 ± 9.46
M2	256.56 ±21.94	300.44 ±13.79	270.10 ±17.65	174.06 ±14.24	229.58 ±24.50	230.75 ±16.59
M3	101.10 ± 4.58	196.79 ±19.93	124.72 ±18.18	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
M4	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
GLUCOSA						
M5	297.83 ±18.82	264.10 ± 3.94	280.21 ± 9.97	261.85 ±86.20	268.02 ± 8.49	237.23 ± 4.52
M6	324.46 ±15.28	278.81 ± 4.35	280.46 ± 9.32	248.85 ±11.13	272.19 ± 8.53	250.63 ± 6.28
M7	267.67 ±17.29	295.48 ± 2.68	235.21 ± 5.50	221.46 ±13.46	261.06 ± 6.76	220.75 ±10.71
M8	89.79 ±4.45	118.17 ± 3.02	128.81 ± 5.54	57.88 ±1.54	84.17 ±4.76	44.27 ±3.15

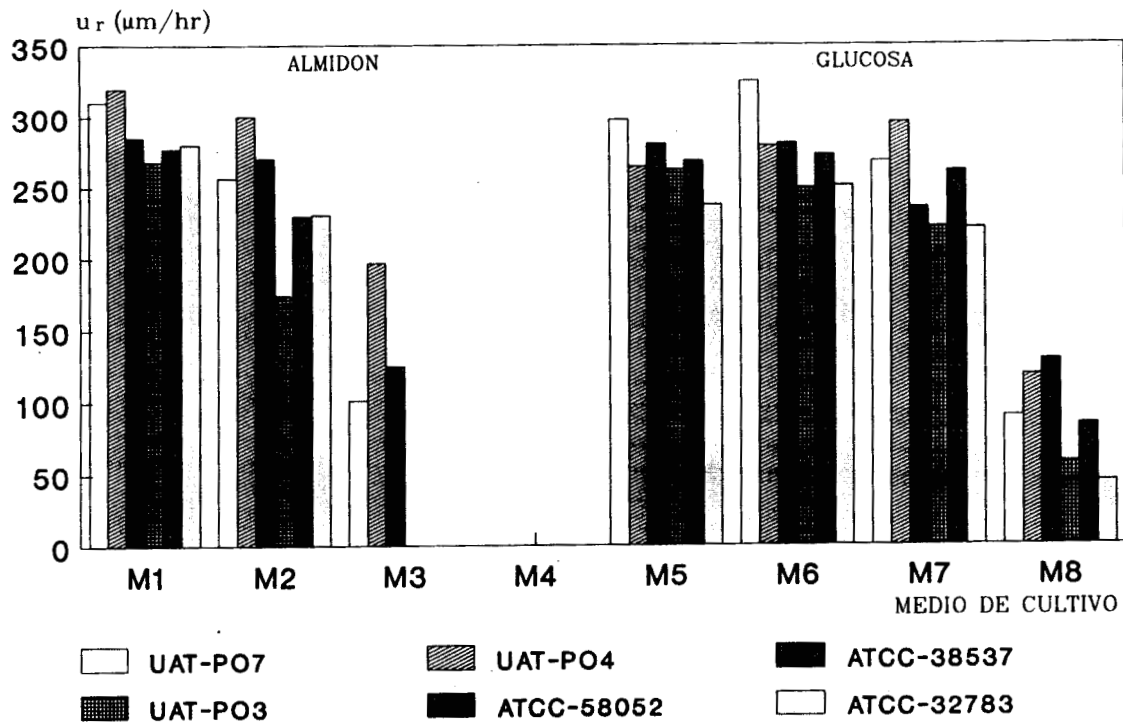


FIGURA 4. EFECTO DE LA 2-DG SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO RADIAL (u_r) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* A 25°C.

También, para todas las cepas experimentadas la velocidad de crecimiento radial, en el medio de cultivo que contenía almidón como fuente de carbono (M1), fue mayor que la u_r en el medio de cultivo que contenía almidón y la mínima concentración de 2-DG, 0.01 g/L (M2). Sin embargo, en este último medio de cultivo las cepas UAT-PO4 y UAT-PO7 fructificaron *in vitro* (FIGURAS 20 y 21), a los 70 y 60 días respectivamente, lo que indica que no existe una relación directa entre la velocidad de crecimiento radial y la fructificación. KLIUSHNIKOV y col. (1935) reportaron que el almidón es un medio desfavorable para la fructificación, y que la celulosa y la glucosa son favorables (BLOCK y col., 1959; KOCK, 1958), lo que indica la influencia probable de la 2-DG, a nivel de estimulación de algunas enzimas responsables en la fructificación (ver FIGURA 1), por su relación química con la N-acetilglucosamina y glucosamina, ó por su relativamente fácil conversión a alguno de estos azúcares, puesto que DE ROUSSET-HALL y GOODAY (1975) indicaron que a bajas concentraciones, la glucosamina también es un activador alostérico de la quitinsintetasa; esta probable evidencia está apoyada porque ninguna de estas cepas fructificaron, en los medios de cultivos M1 ó M5, que no contenían 2-DG. El medio de cultivo en el que fructificaron fue muy similar a las condiciones del hábitat natural del hongo, lo que puede explicar el hecho que las cepas no fructificaran en el medio de cultivo análogo del M2, es decir el medio que contenía glucosa como fuente de carbono más 0.01 g/L de 2-DG (M6).

En el medio de cultivo que contenía almidón como fuente de carbono y 0.1 g/L de 2-DG (M3), sólo crecieron las cepas UAT-PO4, ATCC-38537 y UAT-PO7; resultando la composición en este medio de cultivo muy tóxica para las cepas ATCC-32783, ATCC-58052 y UAT-PO3, mientras que en el medio de cultivo que contenía como fuente de carbono almidón y 1.0 g/L de 2-DG (M4), ninguna cepa creció. Esto no ocurrió en el medio de cultivo análogo que contenía glucosa como fuente de carbono y 1.0 g/L de 2-DG. (M8).

MOORE (1981) sugirió que la interacción entre los azúcares y la 2-DG en los pasos de transporte, se podría relacionar por la habilidad de

153959

la glucosa para revertir la inhibición de crecimiento causado por 2-DG. En todos los casos en que se ha realizado una comparación entre el efecto de 2-DG en glucosa y fructosa, la inhibición es mayor en el medio que contiene fructosa, que en el medio que contiene glucosa. En levaduras existen diferencias en sensibilidad de 2 á 3 veces, dependiendo si el medio contiene una u otra fuente de carbono (HEREDIA y col., 1964), y en hongos filamentosos las diferencias fueron de aproximadamente 10 hasta 100 veces (MOORE y DEVADATHAM, 1979). Estos efectos se interpretan, que son debidos a la relativa habilidad de la fructosa y glucosa, para inhibir el consumo del análogo dentro de la célula, reflejándose la habilidad de mecanismos de transporte por los diferentes azúcares. Claramente la fructosa es menos efectiva que la glucosa para inhibir el consumo de análogos inhibitorios. Esto es lo que probablemente ocurrió en la diferencia en el crecimiento de los medios de cultivo M4 y M8, donde el almidón (M4) es menos efectivo para inhibir el consumo de los análogos que la glucosa (M8).

En los medios de cultivo que contenían glucosa como fuente de carbono, en general la μ_r fue mayor en el medio que contenía la mínima concentración de 2-DG (M6), que en el medio de cultivo que no contenía 2-DG (M5), excepto para la cepa UAT-PO3, que presentó una velocidad de crecimiento relativamente mayor en el medio de cultivo M5.

El análisis estadístico de estos resultados indicó que la mayor velocidad de crecimiento radial, se presentó en los medios de cultivo que contenían; almidón sin 2-DG (M1), glucosa sin 2-DG (M5) y glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), estos medios de cultivo no presentaron diferencia significativa entre sí. Los medios de cultivo M5 y M6 a su vez no presentaron diferencia significativa con los medios de cultivo que contenían glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7) y almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2). Los medios de cultivo que tuvieron una velocidad de crecimiento significativamente menor son los que contuvieron glucosa y 1.0 g/L de 2-DG (M8) y almidón con 0.1 g/L de 2-DG (M3). Las cepas UAT-PO4, UAT-PO7 y ATCC-38537, presentaron la mayor velocidad de crecimiento radial, no existiendo

diferencias significativas entre sí. Esta última cepa no presentó diferencias significativas con la cepa ATCC-58052, mostrando una u_p intermedia. A su vez, la cepa 58052 no presentó diferencias significativas con las cepas ATCC-32783 y UAT-PO3 que correspondieron al grupo con menor velocidad de crecimiento radial.

6.2 Diámetro de la hifa distal (D_{hd}).

Los resultados obtenidos en relación al diámetro de la hifa distal se presentan en la TABLA V y FIGURA 5. El promedio del D_{hd} se encuentra de 8.986 ± 0.085 micras, en el medio de cultivo que contenía glucosa como fuente de carbono más 0.1 g/L de 2-DG (M7), para la cepa ATCC-58052, hasta 2.674 ± 0.04 micras en el medio de cultivo que contenía glucosa como fuente de carbono más 1.0 g/L de 2-DG (M8), para la cepa UAT-PO3.

La adición de 2-DG a los distintos medios de cultivo tuvo el efecto de reducir el D_{hd} cuando el medio fue almidón. En cambio cuando el medio tenía glucosa, la adición de 2-DG tuvo un efecto muy variable según la cepa. En forma peculiar, las cepas resistentes a 2-DG con almidón (UAT-PO4, UAT-PO7 y ATCC-38537), se engrosaron con bajos niveles de 2-DG para luego adelgazarse con altos niveles. En cambio las cepas sensibles a 2-DG (UAT-PO3, ATCC-32783, ATCC-58052) presentaron un aumento de D_{hd} cuando se añadió 2-DG a los medios con glucosa, excepto en el medio de medio de cultivo M8. El significado de este efecto es aún desconocido.

El análisis estadístico indicó que el mayor diámetro de las hifas distales se presentó en los medios de cultivo que contenían; glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), y almidón sin 2-DG (M1), no presentaron diferencias significativas entre sí, seguidos del diámetro de la hifa distal en el medio de cultivo que contenía glucosa sin 2-DG (M5), en seguida se agruparon los medios de cultivo que contenían almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2) y glucosa más 1.0 g/L de 2-DG (M8) que no presentaron diferencia significativa entre sí, el diámetro de la hifa distal

significativamente menor se presentó en el medio de cultivo que contenía almidón más 0.1 g/L de 2-DG (M3).

TABLA V. EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA SOBRE EL DIAMETRO DE LAS HIFAS DISTALES (D_{hd} [=] micras) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, A 25 °C.

MEDIO DE CULTIVO	CEPA UTILIZADA					
	UAT PO7	UAT PO4	ATCC 58537	UAT PO3	ATCC 58052	ATCC 32783
ALMIDON						
M1	5.768 ±0.83	7.107 ±0.60	7.342 ±0.87	6.687 ±0.54	8.136 ±0.75	7.932 ±0.60
M2	4.802 ±0.89	4.798 ±1.57	5.384 ±0.80	5.794 ±0.63	5.930 ±0.48	4.256 ±0.55
M3	4.155 ±0.45	5.605 ±1.40	4.931 ±0.55	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
M4	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
GLUCOSA						
M5	3.416 ±0.38	4.507 ±0.79	6.923 ±1.34	6.292 ±0.55	8.800 ±1.00	8.655 ±0.89
M6	5.876 ±0.87	7.127 ±1.13	8.815 ±0.68	6.024 ±0.78	8.960 ±0.66	8.907 ±1.04
M7	4.482 ±0.40	6.835 ±1.19	8.272 ±1.15	6.544 ±0.49	8.986 ±0.85	8.618 ±0.86
M8	3.880 ±0.73	5.466 ±0.71	7.603 ±0.97	2.674 ±0.04	5.257 ±0.40	6.153 ±0.76

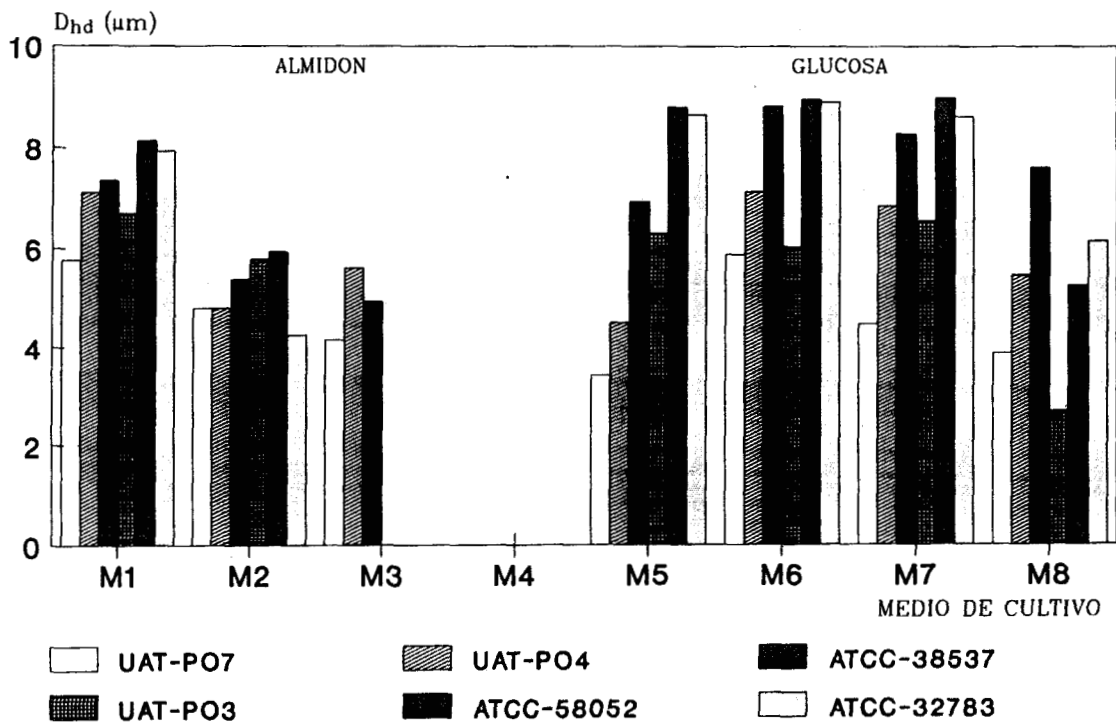


FIGURA 5. EFECTO DE LA 2-DG SOBRE EL DIAMETRO DE LAS HIFAS DISTALES (D_{hd}) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* A 25°C.

6.3 Longitud de hifas distales (L_{hd}).

Se presentan en la TABLA VI y FIGURA 6, los resultados obtenidos en la longitud de hifas distales de la diferentes cepas experimentadas. El mayor promedio de la longitud de las hifas distales fue de 824.5 ± 210 micras en el medio de cultivo que contenía almidón (M1), en la cepa UAT-PO7, hasta 306.10 ± 90 micras en el medio de cultivo que contenía glucosa más 1.0 g/L de 2-DG (M8), para la cepa ATCC-32783.

En general se observó un efecto de la 2-DG, en la disminución de la longitud de las hifas distales (FIGURA 6), lo que repercutió a su vez en la disminución del avance micelial y por consecuencia en la velocidad de crecimiento radial (u_r). Es decir que la adición de 2-DG en los medios de cultivo que contenían almidón produjo micelios con ramas cortas (FIGURA 6) y delgadas (FIGURA 5) y de avance lento (FIGURA 4) que dieron lugar a un crecimiento denso del cultivo. En cambio la adición de 2-DG en medios con glucosa produjo resultados muy irregulares en lo que respecta a la longitud de la hifas distales (L_{hd}), lo cual sugiere que las cepas utilizan 2-DG de manera muy distinta en presencia de glucosa.

La L_{hd} en el medio de cultivo que contenía almidón (M1), es mayor que la longitud de la hifa distal en los medios de cultivo que contenían; glucosa sin 2-DG (M5), excepto para la cepa UAT-PO4, y almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2), excepto para las cepas UAT-PO4 y ATCC-38537. La menor longitud de la hifa distal, en la serie de medios de cultivo que contenían almidón como fuente de carbono, se presentó en el medio de cultivo que contenía almidón más 0.1 g/L de 2-DG (M3).

En el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), la longitud de la hifa distal fue mayor que en el medio de cultivo que contenía glucosa sin 2-DG (M5), para las cepas UAT-PO3, UAT-PO7 y ATCC-32783; la L_{hd} en el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), fue mayor que longitud de la hifa distal en el medio de cultivo sin 2-DG (M5), para las cepas UAT-PO3 y ATCC-32783.

TABLA VI. EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA SOBRE LA LONGITUD DE LAS HIFAS DISTALES (L_{hd} [=] micras) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, A 25 °C.

MEDIO DE CULTIVO	CEPA UTILIZADA					
	UAT PO7	UAT PO4	ATCC 38537	UAT PO3	ATCC 58052	ATCC 32783
ALMIDON						
M1	824.5 ± 210	754.4 ± 164	703.5 ± 201	790.3 ± 174	811.9 ± 182	702.5 ± 163
M2	742.6 ± 151	790.0 ± 160	802.3 ± 204	602.3 ± 137	775.7 ± 190	636.7 ± 172
M3	536.3 ± 108	433.8 ± 116	517.9 ± 137	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
M4	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
GLUCOSA						
M5	682.7 ± 125	805.3 ± 127	573.1 ± 134	688.7 ± 129	652.3 ± 127	577.1 ± 133
M6	730.6 ± 126	700.7 ± 135	540.2 ± 121	790.7 ± 224	578.1 ± 124	672.0 ± 123
M7	669.5 ± 126	792.2 ± 209	702.9 ± 181	707.8 ± 121	588.8 ± 144	722.5 ± 186
M8	412.5 ± 83	521.9 ± 116	433.4 ± 99	310.5 ± 75	386.8 ± 111	306.1 ± 90

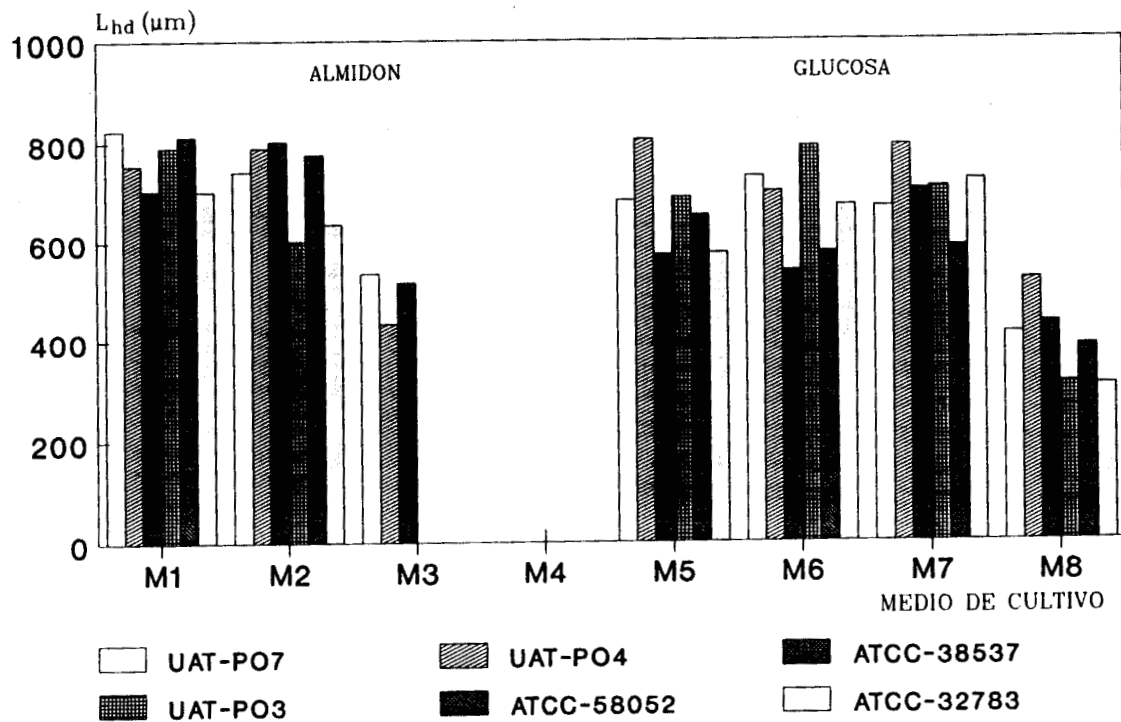


FIGURA 6. EFECTO DE LA 2-DG SOBRE LA LONGITUD DE LAS HIFAS DISTALES (L_{hd}) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* A 25°C.

La menor longitud de la hifa distal, en la serie de medios de cultivo que contenían glucosa como fuente de carbono, se observó en el medio de cultivo que contenía la mayor concentración de 2-DG probada 1.0 g/L (M8). Se apreció una disminución importante en la longitud de la hifa distal, con una concentración elevada de 2-DG, como lo muestra la L_{hd} obtenida en los medios de cultivo M3 y M8.

El análisis estadístico de estos resultados indicó que la mayor longitud de las hifas distales se presentó en el medio de cultivo que contenía almidón sin 2-DG (M1), seguido de los medios de cultivo que contenían almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2) y glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), que no presentaron diferencias significativas entre sí, los medios de cultivo que presentaron una longitud de hifas distales intermedia fueron los medios de cultivo con glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6) y glucosa sin 2-DG (M5), no presentando diferencias significativas entre sí. La menor longitud de las hifas distales se presentó en los medios de cultivo que contenían glucosa más 1.0 g/L de 2-DG (M8), seguido del medio con almidón más 0.1 g/L de 2-DG (M3). Las cepas UAT-PO4 y UAT-PO7, mostraron una longitud de hifa distal significativamente mayor, seguidas de la cepa ATCC-38537, las cepas que presentaron L_{hd} intermedia son UAT-PO3 y ATCC-58052. El grupo de cepas con L_{hd} significativamente menor fueron ATCC-58052 y ATCC-32783, que no presentaron diferencias significativas entre sí.

6.4 Tasa específica de crecimiento (μ_{cal}).

Con los datos obtenidos de la velocidad de crecimiento radial (u_r), diámetro (D_{hd}) y longitud de las hifas distales (L_{hd}), se evaluó la tasa específica de crecimiento (μ_{cal}), los resultados se muestran en la TABLA VII y FIGURA 7. En el medio de cultivo que contenía almidón como fuente de carbono (M1), la mayor μ_{cal} fue para las cepas UAT-PO4, ATCC-38537 y ATCC-32783; y en el medio de cultivo análogo que contenía glucosa (M5), es para las cepas ATCC-38537, ATCC-32783 y ATCC-58052. En general la tasa de crecimiento específica fue mayor

en el medio de cultivo M5 que en el medio de cultivo M1, excepto para la cepa UAT-PO4.

TABLA VII. EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ESPECIFICA ($\mu_{gal} [=] \text{hr}^{-1}$) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, A 25 °C.

MEDIO DE CULTIVO	CEPA UTILIZADA					
	UAT PO7	UAT PO4	ATCC 38537	UAT PO3	ATCC 58052	ATCC 32783
ALMIDON						
M1	0.0213	0.0251	0.0245	0.0197	0.0205	0.0245
M2	0.0190	0.0207	0.0186	0.0172	0.0168	0.0200
M3	0.0108	0.0288	0.0143	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
M4	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
GLUCOSA						
M5	0.0229	0.0176	0.0305	0.0224	0.0263	0.0269
M6	0.0255	0.0240	0.0347	0.0179	0.0311	0.0237
M7	0.0221	0.0217	0.0208	0.0185	0.0292	0.0190
M8	0.0129	0.0137	0.0202	0.0109	0.0140	0.0101

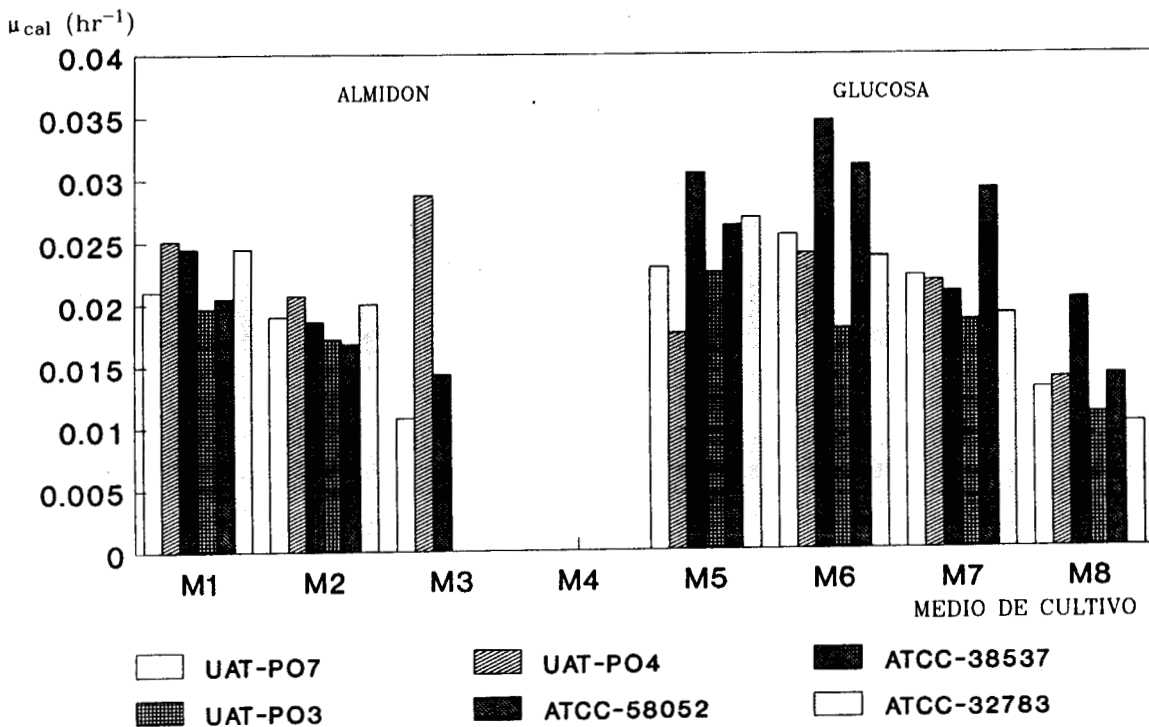


FIGURA 7. EFECTO DE LA 2-DG SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ESPECIFICA (μ_{cal}) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* A 25°C.

153959

Se observó que la tasa específica de crecimiento de las cepas, en los medios de cultivo que contienen almidón como fuente de carbono, disminuyó al adicionar 2-DG, excepto para la cepa UAT-PO4 en el medio de cultivo que contenía 0.1 g/L de DG (M3), donde la tasa específica de crecimiento superó a la obtenida en el medio de cultivo que no contenía 2-DG (M1). En la serie de medios de cultivo que contenían glucosa como fuente de carbono, la μ_{cal} en el medio de cultivo con 0.01 g/L de 2-DG (M6) fue mayor para las cepas UAT-PO4, UAT-PO7, ATCC-38537 y ATCC-58052, en el medio de cultivo que contenía 0.1 g/L de DG (M7), la tasa específica de crecimiento disminuyó para las cepas UAT-PO4 y ATCC-58052, pero fue mayor que la μ_{cal} manifestada en el medio de cultivo que no contenía 2-DG (M5); en la cepa UAT-PO7, no se apreció cambio en la tasa específica de crecimiento en los medios de cultivo M5 y M7. En todos los casos la tasa específica de crecimiento, disminuyó considerablemente en el medio de cultivo que contenía la máxima concentración de 2-DG experimentada (M8), la mayor μ_{cal} en este medio fue para las cepas ATCC-38537, ATCC-58052, y UAT-PO4.

En general la tasa específica de crecimiento fue mayor para la serie de medios de cultivo que contenían glucosa como fuente de carbono (M5, M6, M7 y M8), que en los medios que contenían almidón como fuente de carbono (M1, M2, y M3).

De acuerdo con la ecuación (12) indicada en la sección de Metodología, el efecto combinado de cambios en u_r , D_{hd} , y L_{hd} se puede ponderar al considerar su efecto sobre la tasa específica de crecimiento (μ_{cal}). Este índice se aumenta con incrementos en u_r y con la disminución de D_{hd} y L_{hd} . Es decir las hifas más cortas y delgadas que alcanzan una más alta velocidad de crecimiento apical son las que más biomasa producen.

La adición de 2-DG a los medios con almidón produjo un efecto global de reducción de μ_{cal} . Este efecto fue más pronunciado en las cepas sensibles a 2-DG (UAT-PO3, ATCC-32783 y ATCC-58052), según se muestra en la TABLA VII y FIGURA 7. Sin embargo la adición de 2-DG a los medios con glucosa produjo efectos muy diversos según las cepas.

Las cepas resistentes UAT-PO4, UAT-PO7 y ATCC-38537), mostraron un efecto estimuladorio sobre μ_{cal} a dosis bajas de 2-DG (0.01 g/L). En cambio las cepas UAT-PO3 y ATCC-32783 que fueron 2-DG sensibles con almidón, fueron a la vez deprimidas por 2-DG en los medios con glucosa, aunque la cepa ATCC-58052 sensible a 2-DG en almidón también presentó un efecto estimuladorio con 2-DG y glucosa.

El efecto estimuladorio de 2-DG en presencia de glucosa no es fácil de explicarse, pero indica que las cepas se ajustan al agente tóxico de manera diversa y que quizás tengan modificados de forma distinta sus mecanismos de control del metabolismo y del crecimiento.

TRINCI y COLLINGE (1973) indicaron que el efecto de la sorbosa, un análogo tóxico de la glucosa, en *Neurospora crassa*; desarrollado en medio de cultivo sólido redujo importantemente, la tasa de crecimiento radial y el efecto fue menor en la tasa específica de crecimiento, en este trabajo se observaron resultados similares como lo indicó el análisis estadístico, puesto que en la velocidad de crecimiento radial se apreció una diferencia significativa que separa en grupos las diferentes cepas, así como a los medios de cultivo; sin embargo esta diferencia no se observó en la tasa específica de crecimiento lo que originó que no sean fácilmente diferenciadas las cepas experimentadas.

El análisis estadístico indicó, que el grupo de medios de cultivo en los que se presentó la mayor tasa específica de crecimiento fueron los medios de cultivo que contenían; glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), glucosa sin 2-DG (M5), glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7) y almidón sin desoxiglucosa (M1), éstos tres últimos medios (M5, M7 y M1) no presentaron diferencias significativas con el medio que contenía almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2), este último medio de cultivo a su vez no presentó diferencias estadísticamente significativas con el medio de cultivo que contenía glucosa como fuente de carbono más 1.0 g/L de 2-DG (M8); la velocidad de crecimiento específica, estadísticamente menor se presentó en los medios de cultivo M8 y en el medio de cultivo que contenía almidón como fuente de carbono más 0.1 g/L de 2-DG (M3), que no presentaron

diferencias significativas entre sí. Estadísticamente se presentan 2 grupos de cepas, en base a la tasa específica de crecimiento manifestada, un grupo formado por las cepas, ATCC-38537, UAT-PO4, ATCC-58052, UAT-PO7 y ATCC-32783, que presentaron una μ_{cal} significativamente mayor y el grupo de las cepas ATCC-58052, UAT-PO7, ATCC-32783 y UAT-PO3 que mostraron una tasa específica de crecimiento estadísticamente menor.

6.5 Consumo de glucosa y producción de biomasa.

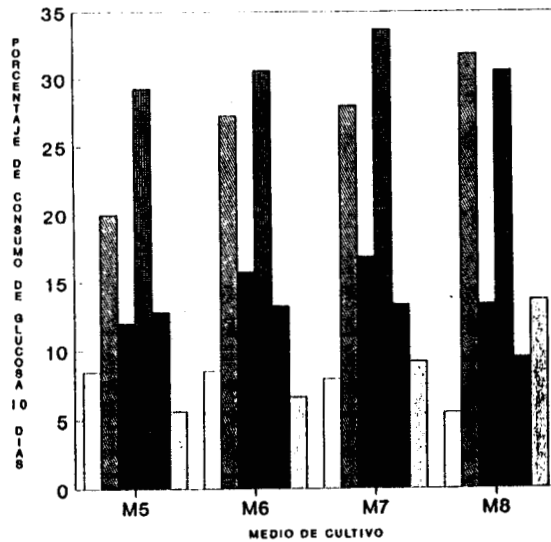
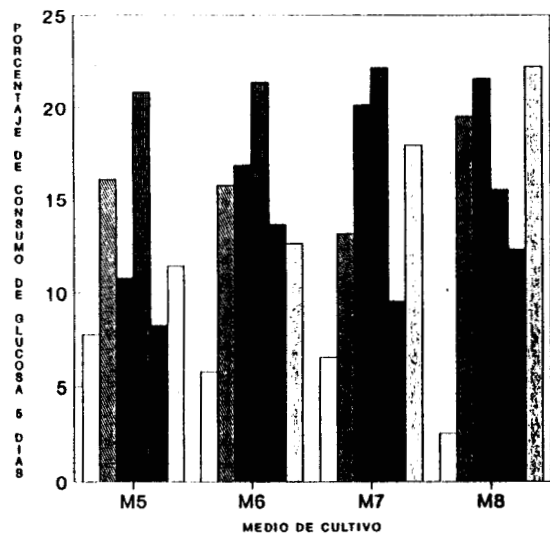
6.5.1 Porcentaje de consumo de glucosa.

El porcentaje de consumo de glucosa, a los 5 y 10 días de desarrollo de las cepas de *Pleurotus ostreatus* UAT-PO3, UAT-PO4, UAT-PO7, ATCC-32783, ATCC-38537 y ATCC-58052; desarrolladas en medios de cultivo que contenían, glucosa como fuente de carbono sin 2-DG (M5), glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7) y glucosa más 1.0 g/L de 2-DG (M8), se presenta en la FIGURA 8.

A los 5 días de desarrollo (izquierda en la FIGURA 8), el mayor porcentaje de consumo de glucosa fue para la cepa UAT-PO3 (entre 20.86% para el M5 y 22.16% para el M7), excepto en el medio de cultivo M8, en donde la cepa que más consumió glucosa fue la cepa ATCC-32783 (22.23%). En todos los medios de cultivo el menor consumo de glucosa fue para la cepa UAT-PO7 (entre 7.79% en el M5 y 2.60% en el M8), la cepa ATCC-38537 incrementó su consumo de glucosa conforme aumentó la concentración de 2-DG, la cepa UAT-PO4 presentó un consumo de glucosa intermedio en relación a las otras cepas experimentadas, la cepa ATCC-58052 aumentó su consumo de glucosa, en el medio de cultivo M6 y bajó en el medio de cultivo M7. Generalmente a los 10 días de desarrollo de las cepas, el micelio del hongo había invadido completamente el medio de cultivo en la caja de Petri y empezaba a extenderse por la superficie de ésta, por lo que este efecto de "obstrucción del crecimiento", probablemente alteró los resultados en este tiempo de desarrollo. Se observó que el mayor consumo de glucosa lo realizó la cepa UAT-PO3 (30.52% en el

M8, 33.67% en el M7), la cepa UAT-PO4 consumió un poco menos que la cepa UAT-PO3, las cepas ATCC-38537 y ATCC-58052 consumieron un porcentaje muy similar de glucosa, aunque en general fue más alto para la cepa ATCC-38537. Las cepas UAT-PO7 y ATCC-32783 consumieron similar porcentaje de glucosa, aumentando considerablemente el consumo en el medio de cultivo M8, en el caso de la cepa ATCC-32783.

Como se puede apreciar el consumo de glucosa, de las cepas de esta especie, es muy lento y por consiguiente su crecimiento. En el desarrollo de las cepas; ATCC-32783 en todos los medios de cultivo experimentados, ATCC-38537 en los medios de cultivo M6, M7 y M8, y ATCC-58052 en el medio de cultivo M6 y M8, se observó que el consumo de glucosa fue mayor a los 5 días de desarrollo, que a los 10 días, esto fue probablemente debido a la aparición de productos metabólicos en el medio, en forma de azúcares que también fueron cuantificados, ó quizá por alguna alteración en la "obstrucción del crecimiento", que se dio a los 10 días por falta de espacio en la caja de Petri.



UAT-PO7

UAT-PO4

ATCC-38537

UAT-PO3

ATCC-58052

ATCC-32783

FIGURA 8. PORCENTAJE DE CONSUMO DE GLUCOSA DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* A LOS 5 Y 10 DIAS DE DESARROLLO A 25°C.

6.5.2 Producción de biomasa.

Los resultados que se obtuvieron sobre producción de biomasa se presentan en la FIGURA 9. Se observó que a los 5 días de desarrollo, (izquierda en FIGURA 9) la cepa que mayor cantidad de biomasa produjo fue la UAT-PO3, en el medio de cultivo que contenía glucosa sin 2-DG (M5), y la cepa que menor biomasa produjo fue la ATCC-32783, desarrollada en el medio de cultivo con glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7).

A los 10 días de crecimiento las cepas que mayor cantidad de biomasa produjeron fueron UAT-PO3 y UAT-PO4, que son a la vez las cepas que más glucosa consumieron. Las cepas ATCC-38537 y ATCC-58052, produjeron una cantidad similar de biomasa, en el caso de las cepas UAT-PO7 Y ATCC-32783 produjeron cantidades de biomasa semejantes en los medios de cultivo M7 y M8, en los medios M5 y M6 fue mayor para la cepa UAT-PO7. En general a los 10 días de desarrollo la biomasa producida en el medio de cultivo que contenía glucosa sin 2-DG, fue menor que la biomasa producida en el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), (excepto para las cepas ATCC-58052 y ATCC-32783) y que el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), (excepto para las cepas UAT-PO3 y UAT-PO7); lo que parece indicar que con 2-DG, en el medio de cultivo se produce mayor cantidad de biomasa.

Resultados similares reportaron TRINCI y COLLINGE (1973), GALPIN y col. (1977) en el caso de la sorbosa (análogo tóxico de la glucosa), indicando que su efecto más significativo en *Neurospora crassa*, en medio de cultivo sólido, fue el inducir abundante ramificación, lo que se observó en este trabajo empleando 2-DG, mediante el uso de la técnica del procesamiento digital de imágenes (ver FIGURA 15 y FIGURA 19), esto fue debido a que se altera radicalmente la distribución espacial de la hifa, produciendo colonias densas en las cuales las condiciones adversas (limitación de nutrientes o acumulación de productos, cambio de pH, etc.) se establecen más cerca del margen de la colonia.

El resultado más importante de la producción de biomasa medido por gravimetría fue encontrar en los medios con glucosa que las cepas dgr presentaron un aumento del crecimiento micelial asociado a la adición de 0.01 g/L de 2-DG (M6) en comparación del medio sin 2-DG (M5) y que las cepas 2-DG sensibles fueron inhibidas por dicha adición de 2-DG a excepción de la cepa ATCC-58052 que fue estimulada un poco por la adición de 0.1 g/L de 2-DG. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el método de tratamiento de imágenes (μ_{cal}) presentado en la TABLA VII y confirman que las cepas dgr aparentemente tienen la peculiaridad de adaptarse a la 2-DG aumentando la velocidad de crecimiento pero que esta característica no explica por sí sola el fenotipo dgr pues la cepa ATCC-58052 aumenta su crecimiento con adiciones subletales de 2-DG pero es sensible a este análogo cuando se usa almidón como fuente de carbono.

También se confirma que hay una diferencia importante del efecto de 2-DG sobre el crecimiento de *P. ostreatus* según la fuente de carbono y es que si se usa almidón, el crecimiento se inhibe pero si se usa glucosa a veces se activa. Lo cual sugiere que el efecto de 2-DG puede estar relacionado de algún modo con la producción de enzimas inducibles como la amilasa.

Empleando los resultados obtenidos de consumo de glucosa y producción de biomasa se evaluó el factor de rendimiento ($Y_{x/s}$), que es un parámetro que nos indica en forma concreta como están aprovechando las cepas de *P. ostreatus* el sustrato para su crecimiento.

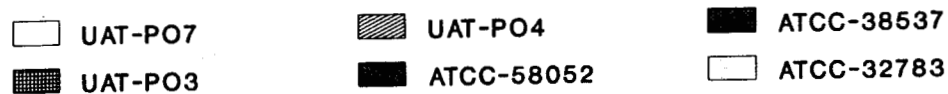
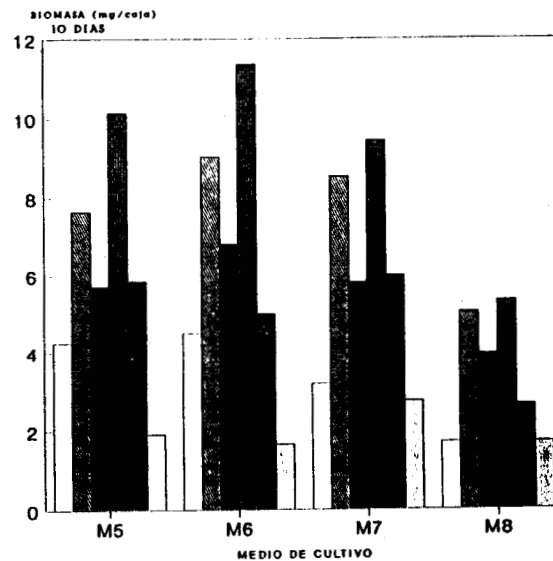
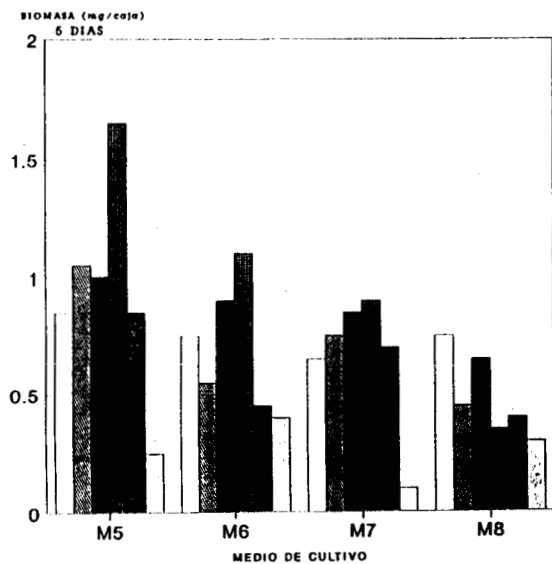


FIGURA 9. PRODUCCION DE BIOMASA DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* A LOS 5 Y 10 DIAS DE DESARROLLO A 25°C.

6.6 Rendimiento en caja Petri.

Los resultados de rendimiento de las cepas experimentadas, en la serie de medios de cultivo que contenían glucosa como fuente de carbono (M5, M6, M7 y M8), se muestran a los 5 y 10 días de desarrollo en la TABLA VIII y FIGURA 10. Se considera que los resultados más representativos son los que se obtuvieron a los 5 días de desarrollo, ya que a los 10 días de desarrollo se había invadido completamente el medio de cultivo y las hifas se extendían por la pared de la caja de Petri.

En general se observó que el rendimiento disminuyó al aumentar la concentración de 2-DG. En el caso de las cepas ATCC-58052 y UAT-PO4 el rendimiento aumentó en el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), pero fue menor que el obtenido en el medio de cultivo que no contenía 2-DG (M5). El rendimiento en la cepa ATCC-32783 aumentó en el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), pero fue menor que el rendimiento obtenido en el medio de cultivo que no contenía 2-DG (M5) y disminuyó al aumentar a una concentración mayor de 2-DG (M7 y M8).

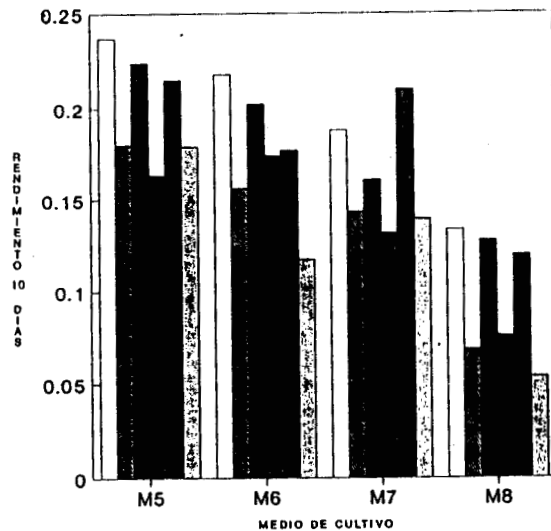
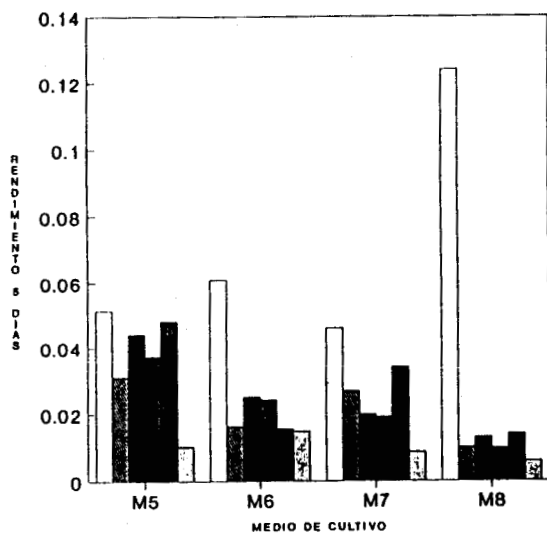
A los 5 días de desarrollo, en todos los medios de cultivo la cepa que presentó menor rendimiento fue la cepa ATCC-32783, se observó una diferencia 20 veces menor en relación al rendimiento obtenido en la cepa UAT-PO7, en el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M8).

A los 10 días la cepa que mejor rendimiento mostró fue la cepa UAT-PO7, excepto en el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), donde la cepa ATCC-58052 presentó un rendimiento, aproximadamente 10% superior. La cepa UAT-PO3 aumentó su rendimiento en el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), en relación al rendimiento obtenido en el medio de cultivo que no contenía 2-DG (M5), en el caso de la cepa ATCC-58052 se apreció un incremento del rendimiento en el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), pero fue menor que el rendimiento obtenido en el medio de cultivo que no contenía 2-DG (M5). En

general la cepa ATCC-32783 fue la que menor rendimiento presentó. Se apreció un efecto de disminución del rendimiento al aumentar la concentración de 2-desoxiglucosa, como se observó a los 5 días de desarrollo.

TABLA VIII. RENDIMIENTO (Y_x/s , [=] mg biom/mg glu) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, EN 5 Y 10 DIAS DE DESARROLLO A 25 °C.

MEDIO DE CULTIVO	CEPA UTILIZADA					
	UAT PO7	UAT PO4	ATCC 38537	UAT PO3	ATCC 58052	ATCC 32783
M5						
5 DIAS	0.051	0.031	0.044	0.037	0.048	0.010
10 DIAS	0.237	0.180	0.224	0.163	0.215	0.179
M6						
5 DIAS	0.061	0.016	0.025	0.024	0.016	0.015
10 DIAS	0.218	0.156	0.202	0.174	0.177	0.177
M7						
5 DIAS	0.046	0.027	0.020	0.019	0.034	0.009
10 DIAS	0.188	0.143	0.161	0.131	0.210	0.139
M8						
5 DIAS	0.124	0.0099	0.013	0.0097	0.014	0.0058
10 DIAS	0.133	0.068	0.127	0.075	0.119	0.053



UAT-PO7
 UAT-PO3

UAT-PO4
 ATCC-58052

ATCC-38537
 ATCC-32783

FIGURA 10. RENDIMIENTO EN CAJA PETRI ($Y_{x/s}$) DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* A LOS 5 Y 10 DIAS DE DESARROLLO A 25°C.

El análisis estadístico indicó que a los 5 días de desarrollo el mayor rendimiento se encontró en los medios; sin 2-DG (M5), 0.01 g/L de 2-DG (M6), y 0.1 g/L de 2-DG (M7) que no presentaron diferencias significativas entre sí, el rendimiento en el medio de cultivo M8 fue significativamente menor. La cepa UAT-PO7 fue la que presentó significativamente mayor rendimiento, seguida del grupo de cepas ATCC-58052, ATCC-38537, UAT-PO4 y UAT-PO3 que no presentaron diferencia significativa entre sí, el grupo de cepas que mostraron el menor rendimiento fueron UAT-PO4, UAT-PO3 y ATCC-32783. A los 10 días de desarrollo el rendimiento fue mayor en el medio de cultivo que no contenía 2-DG (M5), seguido de los medios de cultivo que contenían 0.01 g/L de 2-DG (M6) y 0.1 g/L de 2-DG (M7), que no presentaron diferencia significativa entre sí, el rendimiento significativamente menor se presentó en el medio de cultivo que contenía 1.0 g/L de 2-DG (M8). Las cepas que presentaron rendimiento significativamente mayor fueron; UAT-PO7, ATCC-58052 y ATCC-38537, seguidas de las cepas UAT-PO4, UAT-PO3 y ATCC-32783, que fueron las que presentaron menor rendimiento. Como se puede observar se obtuvieron resultados muy similares en el análisis estadístico, en 5 y 10 días de desarrollo.

6.7 Procesamiento digital de imágenes.

Se esquematiza en la FIGURA 11, el sistema del procesamiento digital de imágenes. En la FIGURAS 12-19 se muestran diferentes impresiones de las hifas de las cepas experimentadas en diferentes medios de cultivo.



FIGURA 11. SISTEMA DE PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGENES.

153959

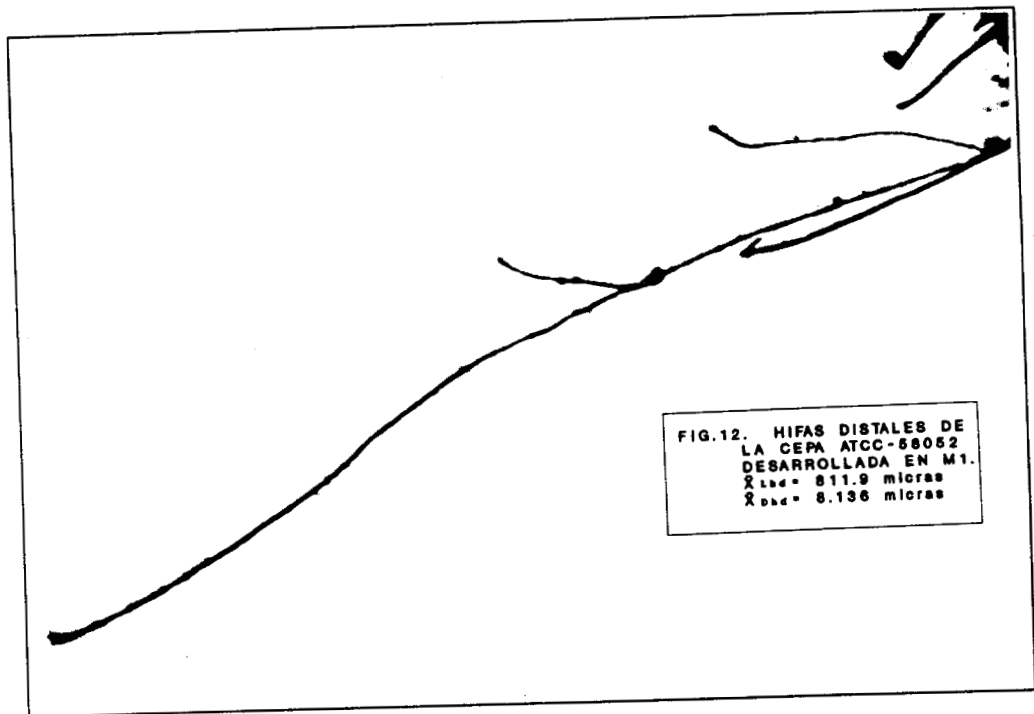


FIG.12. HIFAS DISTALES DE
LA CEPA ATCC-88052
DESARROLLADA EN M1.
 \bar{X}_{Ld} = 811.9 micras
 \bar{X}_{Dd} = 8.136 micras

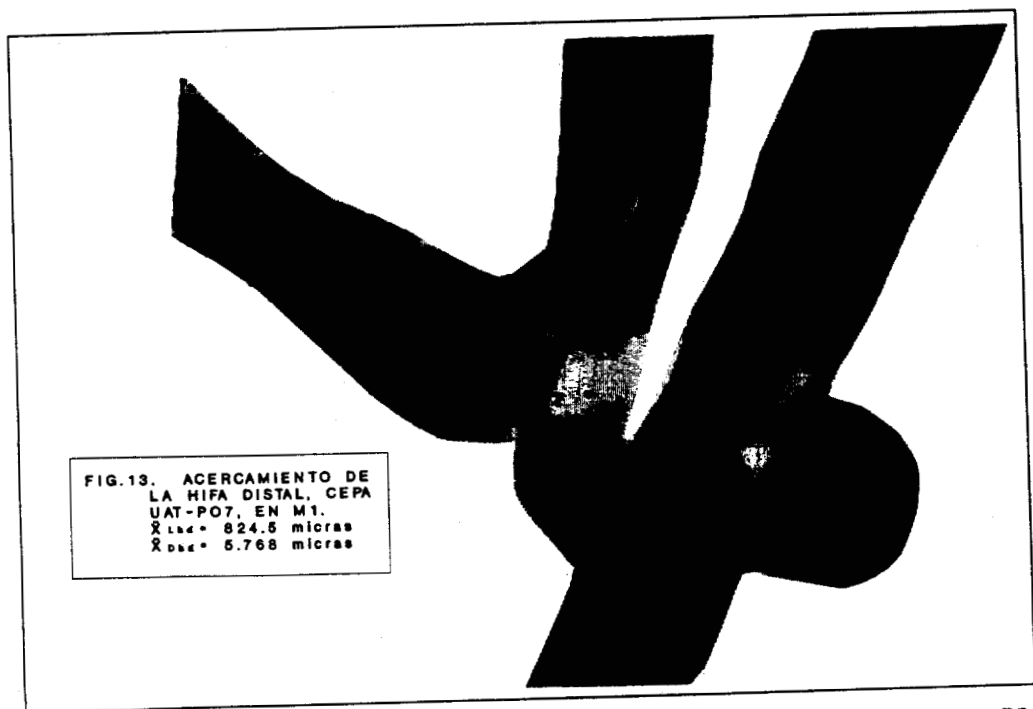


FIG.13. ACERCAMIENTO DE
LA HIFA DISTAL. CEPA
UAT-PO7, EN M1.
 \bar{X}_{Ld} = 824.6 micras
 \bar{X}_{Dd} = 5.768 micras

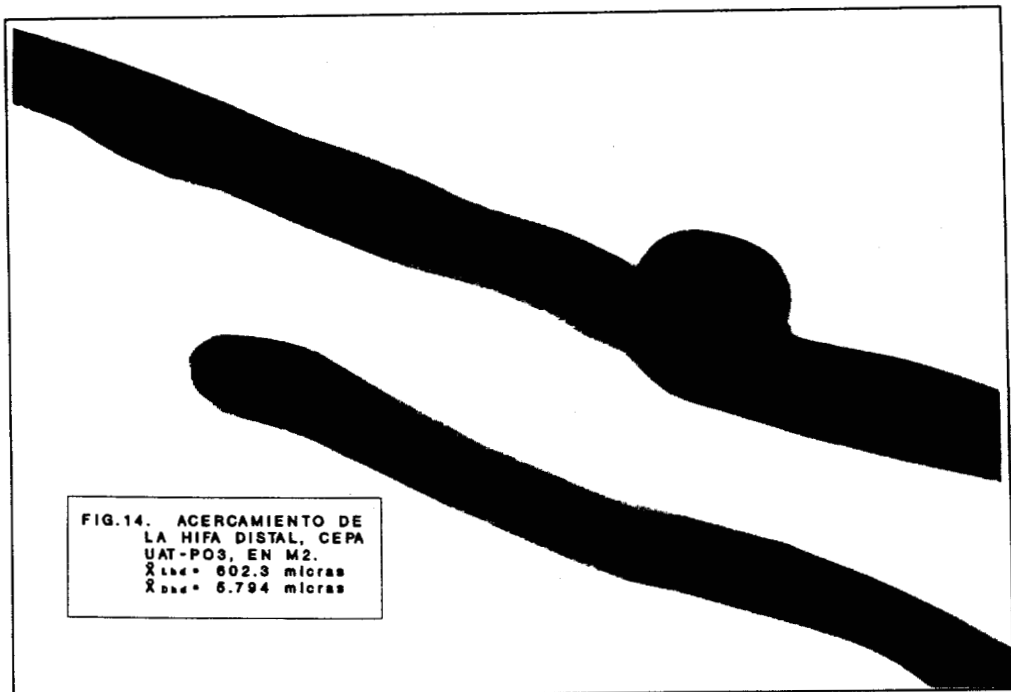


FIG.14. ACERCAMIENTO DE
LA HIFA DISTAL, CEPA
UAT-PO3, EN M2.
 \bar{X}_{LH} = 602.3 micras
 \bar{X}_{DHD} = 6.794 micras

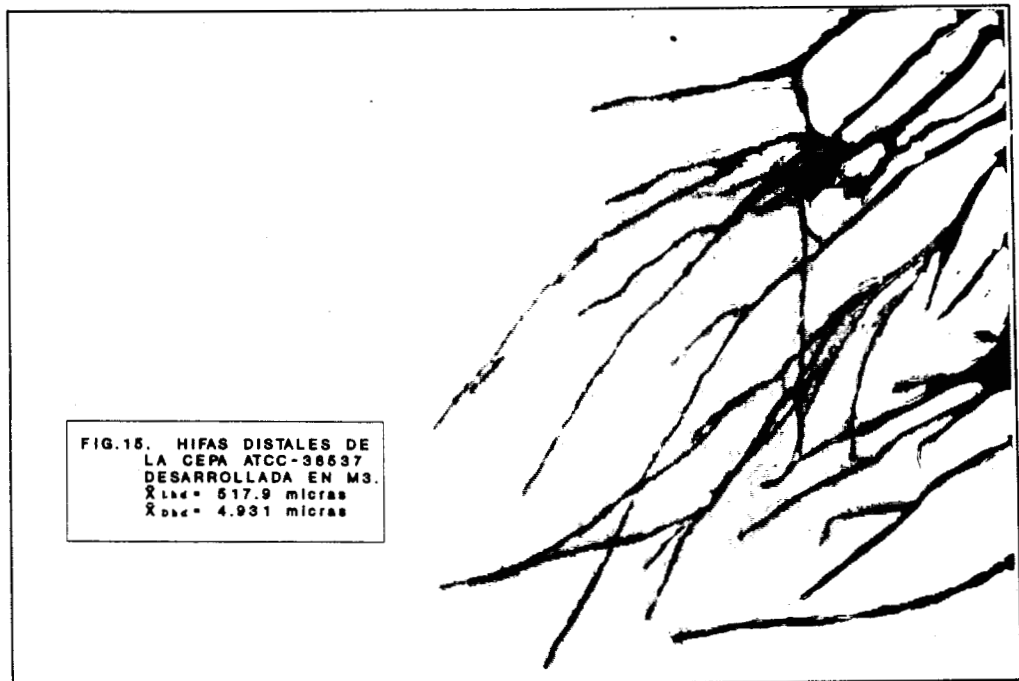
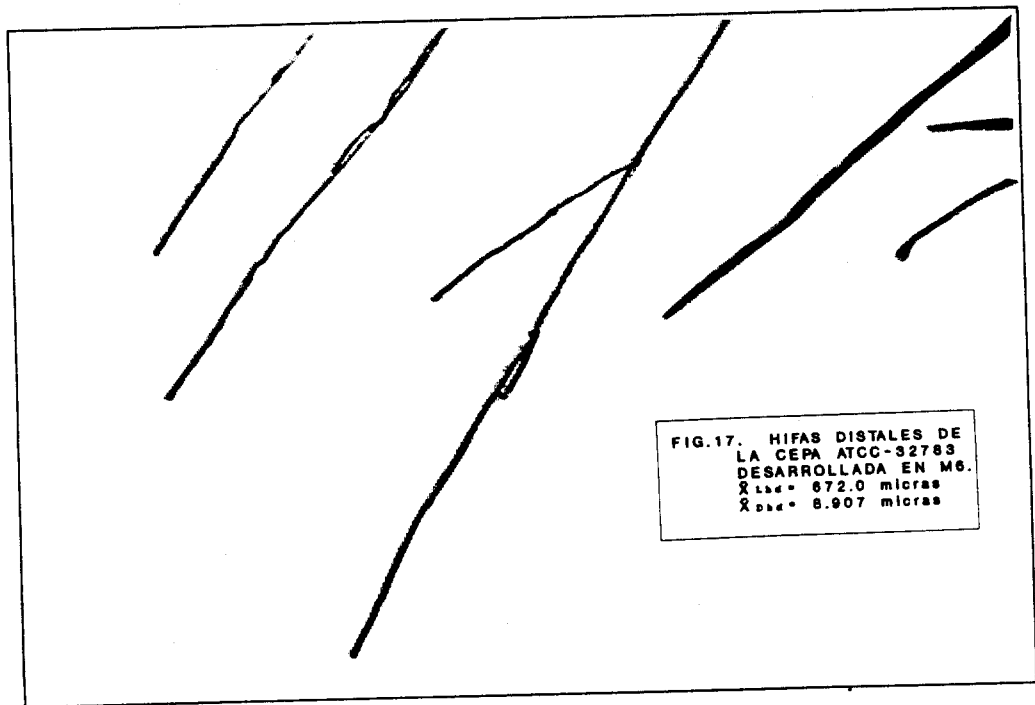
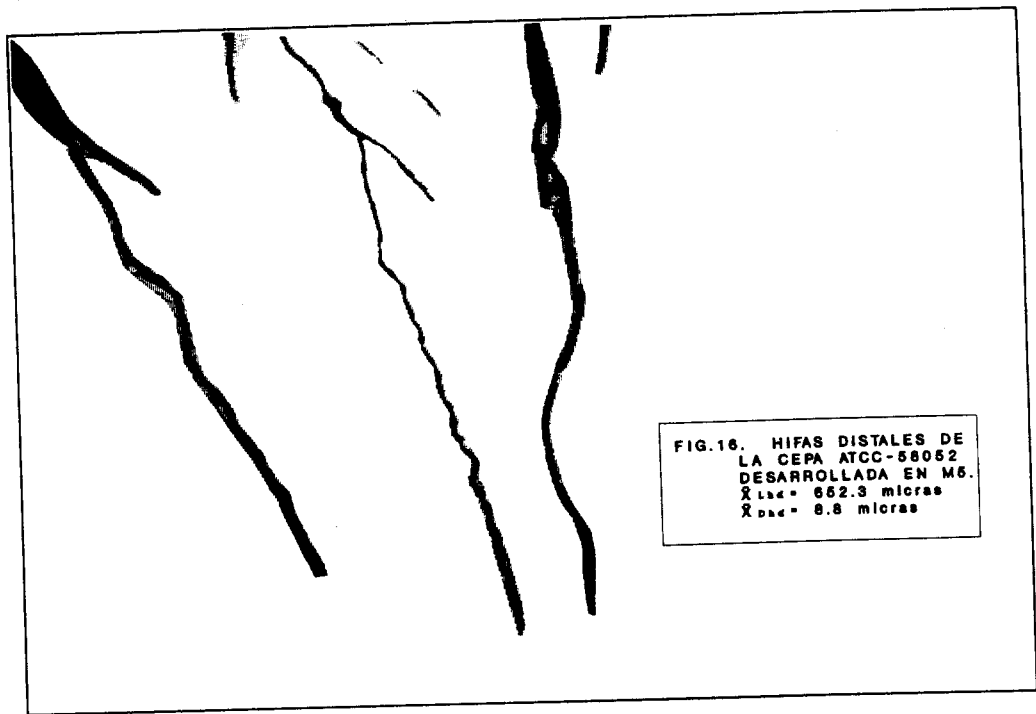
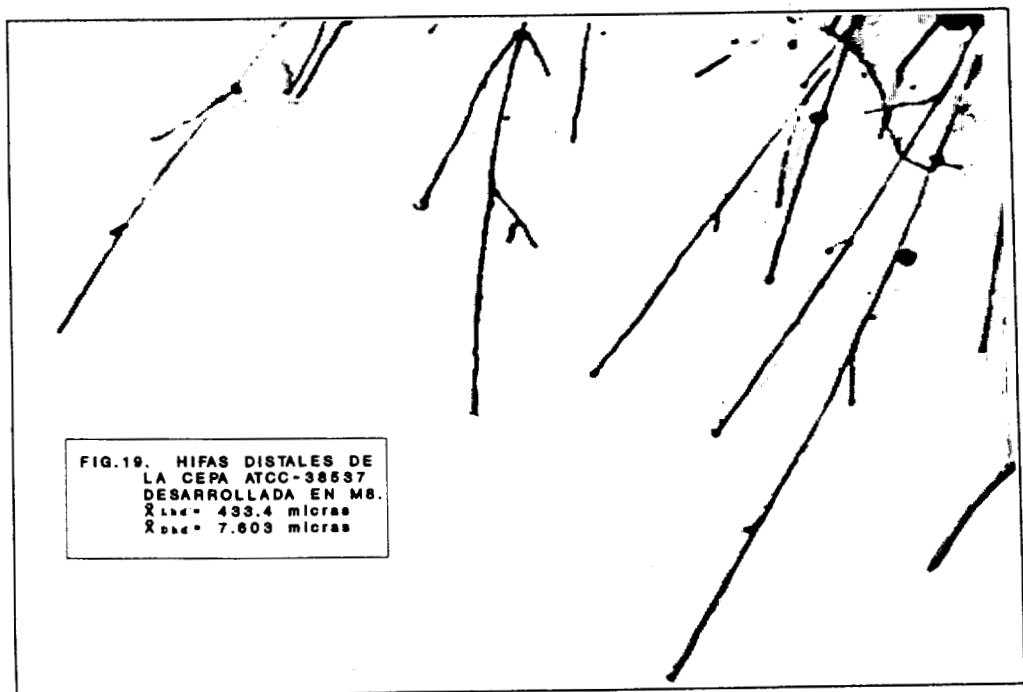
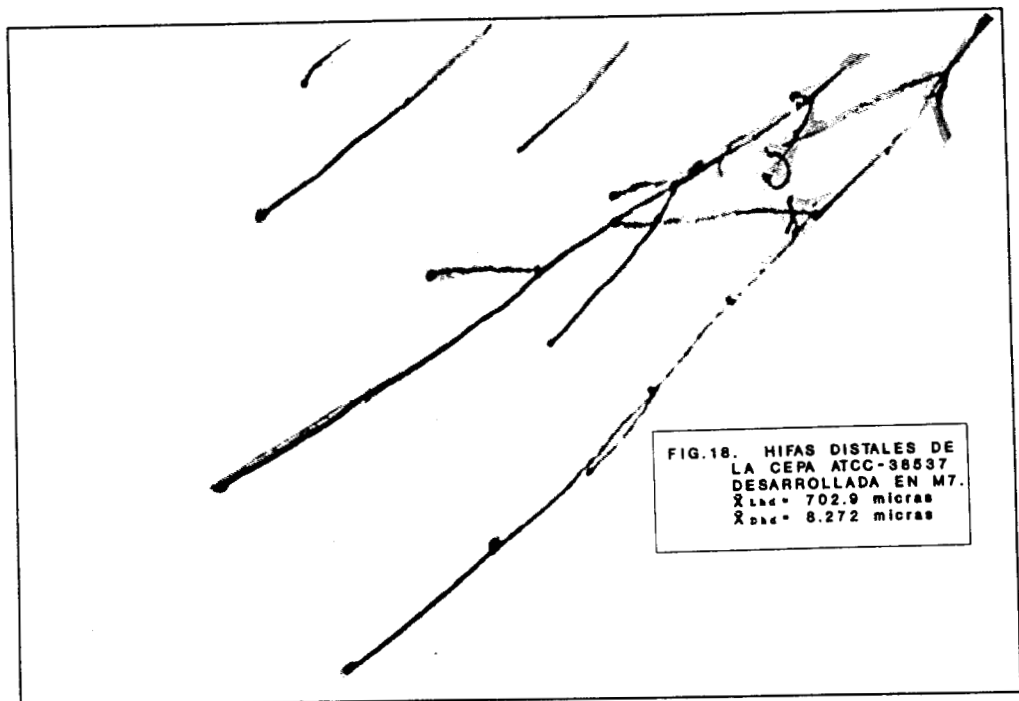


FIG.15. HIFAS DISTALES DE
LA CEPA ATCC-36537
DESARROLLADA EN M3.
 \bar{X}_{LH} = 517.9 micras
 \bar{X}_{DHD} = 4.931 micras





6.8 Comportamiento de las cepas en planta productora.

Se muestran los resultados obtenidos en cultivo de las cepas UAT-PO3, UAT-PO7, UAT-PO4, ATCC-32783, ATCC-38537 y ATCC-58052 en la TABLA IX. En ésta se observa que las cepas de fructificación más rápida son las cepas UAT-PO7, UAT-PO4 y ATCC-38537; las cepas que presentan fructificación tardía son ATCC-32783 y ATCC-58052. La primera cosecha se efectuó de 6 a 9 días después de la fructificación, en las cepas que fructificaron primero se realizó; a los 6 días para la cepa ATCC-38537 a los 9 días para las cepas UAT-PO4 y UAT-PO7; a los 6 días para las cepas ATCC-32783 y ATCC-58052 y a los 9 días para la cepa UAT-PO3, la segunda cosecha se realizó de 17 a 31 días; a los 17 días para la cepa ATCC-58052 sin embargo su producción fue mínima, a los 20 días para la cepa ATCC-38537 y para la cepa UAT-PO4, 26 días para la cepa UAT-PO7 y 31 días para la cepa UAT-PO3, la cepa ATCC-32783 no produjo segunda ni tercera cosecha después de 80 días; la tercera cosecha para la cepa ATCC-58052 se realizó a los 25 días, con una mínima cantidad, en esta cepa la producción se presentó muy desordenada, quizá esta producción corresponda a la segunda cosecha, para la cepa ATCC-38537 se efectuó a los 30 días, en el caso de la cepa UAT-PO4 a los 37 días, para la cepa UAT-PO7 a los 46 días, y a los 55 días para la cepa UAT-PO3, cabe mencionar que las cosechas más importantes en cantidad e incluso en calidad son la primera y segunda. En las FIGURAS 20-25 se presentan los Basidiocarpo de las cepas experimentadas.

Un parámetro muy importante para definir la cepa que se empleará en producción es el % de eficiencia biológica (% E.B.), es decir que cantidad de hongo fresco se produce por cantidad de sustrato seco empleado ($\times 100$), en el presente trabajo las cepas que presentaron mayor % E.B. son UAT-PO4, UAT-PO7, ATCC-38537 y UAT-PO3, aun cuando en esta última el tiempo de fructificación fue mayor el % de E.B. para las cepas ATCC-58052 y ATCC-32783 es muy similar, en esta última cepa el % E.B. se calculó con la producción obtenida en una sola cosecha.

PARAMETRO DE PRODUCCION	CEPA UTILIZADA					
	UAT PO7	UAT PO4	ATCC 38537	UAT PO3	ATCC 58052	ATCC 32783
T. FRUCT. (días)	17 ±2.63	19 ±2.23	23 ±1.42	26 ±4.33	38 ±3.5	53 ±1.55
1ª COSECHA (días)	26 ±2.29	28 ±2.38	29 ±2.65	35 ±2.83	44 ±5.63	59 ±0.98
2ª COSECHA (días)	43 ±3.96	39 ±4.22	43 ±7.14	57 ±9.72	55 ±2.94	**
3ª COSECHA (días)	63 ±7.45	56 ±6.76	52 ±2.14	81 ±19.3	63 ±1.21	**
%E.BIOLOGICA	97.14 ±26.2	100.22 ±22.8	85.03 ±14.6	93.32 ±14.7	34.83 ±7.53	35.94* ±5.92
PRODUCTIVIDAD	15.42	17.90	16.35	11.52	5.53	6.09

TABLA IX. COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, EN PRODUCCION. * % E.B. calculado con una sola cosecha; ** no hubo producción.

El análisis estadístico indicó que las cepas UAT-PO7 y UAT-PO4 fueron las que fructifican más rápido, las cepas que se encuentran en el segundo grupo en tiempo de fructificación fueron UAT-PO4, UAT-PO3 y ATCC-38537, en un tercer grupo se encuentran las cepas ATCC-38537 y UAT-PO3, la cepa ATCC-58052 fue diferente significativamente de las demás cepas al igual que la cepa ATCC-32783 ambas fructificaron tardíamente. En base a el % E.B. no existió diferencia significativa en las cepas UAT-PO4, UAT-PO7, UAT-PO3 y ATCC-38537, las cepas ATCC-58052 y ATCC-32783 presentaron el % E.B. significativamente más bajo.

Desde el punto de vista comercial la productividad es un factor muy importante de una cepa, puede medirse en base a la cantidad de hongos acumulados por cada cosecha X_i ($i = 1, 2, 3$), entre los días acumulados del proceso Δt y dividida entre la cantidad de materia prima seca empleada (M).

$$PR = (X_1 + X_2 + X_3) / M \Delta t$$

Este índice se muestra en la TABLA IX y al comparar los grupos dgr y los 2-DG sensibles se observa que los primeros tuvieron una $PR = 16.54 \pm 1.23$ (Kg de hongo fresco/ton de paja seca por día) a comparación de los segundos donde la $PR = 7.71 \pm 3.31$ (Kg de hongo fresco/ton de paja seca por día). La prueba de t ($n = 3$) para estos dos grupos indica que esas diferencias son altamente significativas. Por lo tanto aunque no se lograron observar diferencias entre grupos en cuanto al tiempo de fructificación o a la eficiencia biológica, el efecto combinado de tiempo y eficiencia que resulta en PR , si mostró estas diferencias lo cual indica la importancia del sistema de selección de cepas aquí estudiado.

En términos prácticos, estos resultados indican que las cepas dgr producirán diariamente el doble de materia comestible por tonelada de sustrato (16.5 Kg/día) que las cepas sensibles a 2-DG (7.71 Kg/día) y que por lo tanto este criterio permite seleccionar cepas de mayor valor productivo. La cepa UAT-PO4 fue la cepa más productiva de todas (18 Kg/día).

6.9 Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* en medios conteniendo 2-desoxiglucosa.

Con objeto de determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* se estudió la velocidad de crecimiento radial (u_r), diámetro de hifas distales (D_{hd}), longitud de hifas distales (L_{hd}) y velocidad de crecimiento específica (μ_{cal}), de las cepas UAT-PO3, UAT-PO4 y UAT-PO7, además de 25 °C a 28 °C y 30 °C, en diferentes medios de cultivo (M1, M2, M3,

M4, M5, M6, M7 y M8). Los resultados obtenidos a 25 °C para estas cepas se presentan anteriormente, con el fin de realizar una comparación más sencilla, en este caso se muestran junto a los resultados obtenidos a 28 °C y 30 °C.

6.9.1 Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento radial (u_r).

Los resultados de la velocidad de crecimiento radial, de las cepas UAT-PO3, UAT-PO4 y UAT-PO7 a 25 °C, 28 °C y 30 °C, se presentan en la TABLA X. Se observó en general que en los medios de cultivo que contenían almidón como fuente de carbono (M1) y almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2), la velocidad de crecimiento radial disminuyó al aumentar la temperatura a 28 °C y 30 °C, con respecto a la manifestada en estos medios de cultivo a 25 °C. En el medio de cultivo que contenía almidón como fuente de carbono más 0.1 g/L de 2-DG (M3), crecieron las cepas UAT-PO4 y UAT-PO7 a 25 °C, a 28 °C disminuyó la velocidad de crecimiento radial en la cepa UAT-PO4 y se estimuló ligeramente la u_r en la cepa UAT-PO7, al aumentar la temperatura a 30 °C la velocidad de crecimiento radial disminuyó en la cepa UAT-PO4 y se inhibió el crecimiento en la cepa UAT-PO7, quizá esto fue debido a que la enzima que se ha encontrado en cepas resistentes a 2-DG, que evita que se acumule la 2-desoxiglucosa-6-fosfato, responsable de la inhibición del crecimiento se inactiva a 30 °C, como lo reportan MARTIN y HEREDIA (1977) quienes aislaron y purificaron de una levadura resistente a la 2-DG, una fosfatasa que evita la acumulación de la 2-desoxiglucosa-6-fosfato, indicaron que esta enzima muestra actividad máxima en valores de pH entre 6 y 7, pierde actividad en valores de pH entre 5-8, la actividad se pierde más aún incubando a la enzima a 35 °C por 5 minutos a pH de 7 y prácticamente la actividad se pierde por completo después de incubarla 5 minutos a 40 °C y pH 7. En este trabajo los medios de cultivo se ajustaron a pH de 6.5, se incubaron a 30 °C para medir el avance micelial a los 2, 3, 4, 5 y 6 días (como se especificó en la metodología), por lo que pudo haber sido la inactivación de la enzima la causa de la inhibición del crecimiento en la cepa UAT-PO7 a 30 °C, aunado al efecto de interacción del almidón con la 2-

desoxiglucosa, en donde el almidón es menos efectivo que la glucosa para revertir la inhibición del crecimiento causada por la 2-desoxiglucosa (MOORE, 1981), ya que esta inhibición no ocurre en el medio de cultivo análogo que contiene la misma concentración de 2-desoxiglucosa que el medio de cultivo M3, pero fuente de carbono glucosa (M7). La cepa UAT-PO4 creció en el medio de cultivo que contiene almidón más 0.1 g/L de 2-DG (M3) a 30 °C, probablemente debido a que esta cepa presenta termoresistencia y por consecuencia un sistema metabólico que responde a estas condiciones de temperatura elevada. En el medio de cultivo que contiene almidón y 1.0 g/L de 2-DG (M4), ninguna cepa creció, debido a que esta concentración, es muy tóxica para las cepas en esta fuente de carbono.

En general en los medios de cultivo que contenían glucosa como fuente de carbono (M5, M6, M7 y M8), la velocidad de crecimiento radial disminuyó al aumentar la temperatura. Sin embargo en la cepa UAT-PO7 la u_r es mayor a 30 °C que a 28 °C, pero no mayor que a 25 °C, sólo en el medio de cultivo que contenía glucosa más 1.0 g/L de 2-DG (M8), la velocidad de crecimiento radial obtenida a 30 °C fue mayor que la u_r obtenida a 25 °C.

El análisis estadístico de estos resultados indicó que los medios de cultivo que contenían almidón sin desoxiglucosa (M1) y glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), presentaron la mayor velocidad de crecimiento radial, este último medio de cultivo junto con los medios de cultivo que contenían, glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7) y almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2) presentaron la u_r intermedia. Los medios de cultivo que contenían glucosa más 1.0 g/L de 2-DG (M8) y almidón más 0.1 g/L de 2-DG (M3) presentaron la velocidad de crecimiento significativamente menor. Por lo que respecta al efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento radial de *P. ostreatus*, la u_r significativamente mayor se presentó a 25 °C, seguida de 30 °C y 28 °C, que no presentaron diferencias significativas entre sí. En relación a las cepas experimentadas, las que presentaron significativamente mayor velocidad de crecimiento radial fueron la

cepa UAT-PO7 y la UAT-PO4, la cepa que presentó significativamente menor u_r fue UAT-PO3.

6.9.2 Efecto de la temperatura en el diámetro de la hifa distal (D_{hd}) de cepas de *P. ostreatus*.

El diámetro de las hifas distales (D_{hd}) de las cepas UAT-PO3, UAT-PO4, y UAT-PO7, desarrolladas en diferentes medios de cultivo, a diferentes temperaturas se muestran en la TABLA XI. No se observó un efecto definido de la temperatura en el diámetro de la hifa distal, sin embargo en algunos casos en el medio de cultivo que contenía almidón como fuente de carbono sin 2-DG (M1) el diámetro de la hifa distal disminuyó al aumentar la temperatura, excepto a 28 °C para la cepa UAT-PO7, donde el diámetro de la hifa distal fue mayor a 28 °C que a 25 °C. En general se aprecia que en las cepas UAT-PO4 y UAT-PO7 el diámetro de las hifas distales se incrementó al aumentar la temperatura y en los medios de cultivo que contenían glucosa como fuente de carbono (M5, M6, M7 y M8), a 28 °C y 30 °C, el diámetro de la hifa distal fue mayor en la cepa UAT-PO7 que en la UAT-PO3.

El análisis estadístico indicó que el mayor diámetro de la hifa distal, se presentó en los medios de cultivo que contenían, glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6) y glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), seguidos del medio que contenía almidón como fuente de carbono sin 2-DG (M1), a continuación siguieron los medios que contenían almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2) y glucosa como fuente de carbono sin 2-DG (M5), que no presentaron diferencia significativa entre sí, el D_{hd} significativamente menor se presentó en los medios de cultivo que contenían, glucosa más 1.0 g/L de 2-DG (M8) y almidón más 0.1 g/L de 2-DG (M3), estadísticamente se apreció un efecto de la 2-DG, en la disminución del diámetro (efecto similar se observa en el D_{hd} de las cepas ATCC-32783, ATCC-38537 y ATCC-58052, a 25 °C, especificado anteriormente). En relación a el efecto de la temperatura en el diámetro de la hifa distal, el D_{hd} significativamente mayor se presentó a 28 °C, no existieron diferencias significativas en el diámetro de las hifas distales a 25 °C y 30 °C. En relación a el diámetro de la hifa distal manifestado, las cepas mostraron

diferencias significativas entre sí; el mayor D_{hd} lo presentó la cepa UAT-PO7, seguida de la cepa UAT-PO4 y el menor diámetro de la hifa distal lo presentó la cepa UAT-PO3, cabe mencionar que en este sentido se apreció igual comportamiento en la longitud de las hifas distales de las cepas experimentadas, como se muestra a continuación.

6.9.3 Efecto de la temperatura en la longitud de hifas distales (L_{hd}) de cepas de *P. ostreatus*.

La longitud de las hifas distales (L_{hd}) de las cepas UAT-PO3, UAT-PO4, y UAT-PO7, desarrolladas en diferentes medios de cultivo, a diferentes temperaturas se muestran en la TABLA XII. Como se observa en los resultados en general, la longitud de las hifas distales disminuyó al aumentar la temperatura de 25 °C a 28 °C y 30 °C; en algunos casos como ocurre en la cepa UAT-PO7, en los medios de cultivo que contenían almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2) y glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), la longitud fue mayor a 30 °C que la longitud a 28 °C, pero menor que a 25 °C, en el caso de la cepa UAT-PO4 ocurrió un comportamiento similar en los medios de cultivo que contenían; almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2), glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7) y glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M8), la longitud de las hifas distales a 30 °C, fue menor que la L_{av} a 25 °C.

El análisis estadístico mostró que la longitud de la hifa distal significativamente mayor se presentó en el medio de cultivo que contenía almidón sin 2-DG (M1), la longitud de la hifa distal en los medios que contenían; almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2), glucosa sin 2-DG (M5), glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6) y glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), no presentaron diferencias significativas entre sí, y constituyeron la longitud intermedia de la hifa distal. la L_{av} mínima se presentó en los medios de cultivo que contenían glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M8) y almidón más 0.1 g/L de 2-DG (M3), siendo en este último medio de cultivo en el que más se afecta la longitud de la hifa distal. En relación a el efecto de la temperatura en la longitud de la hifa distal, la L_{av} disminuyó significativamente al

aumentar la temperatura de 25 °C a 28 °C y a 30 °C, existiendo diferencias significativas entre sí. La cepa UAT-PO7 presentó la longitud de la hifa distal significativamente mayor, seguida de la cepa UAT-PO4, la cepa UAT-PO3 presenta L_{av} significativamente menor, de igual forma se agruparon las cepas en relación a la disminución del diámetro de la hifa distal (D_{hd}).

6.9.4 Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento específica (μ_{cal}) de cepas de *P. ostreatus*.

Los resultados del efecto de la temperatura en la tasa específica de crecimiento de las cepas UAT-PO3, UAT-PO4 y UAT-PO7, se presentan en la TABLA XIII, se observó en general, que la μ_{cal} aumentó al aumentar la temperatura. Las cepas UAT-PO7 y UAT-PO4 desarrolladas en la serie de medios que contenían glucosa como fuente de carbono con diferentes concentraciones de 2-DG (M5, M6, M7 y M8), a 25 °C, 28 °C y 30 °C, presentaron un efecto estimulador de la μ_{cal} , básicamente en los medios que contenían, 0.01 g/L de 2-DG (M6), y 0.1 g/L de 2-DG (M7), bajando la μ_{cal} en el medio de cultivo que contienen 1.0 g/L de 2-DG (M8), probablemente la concentración subletal de 2-DG, estimula el metabolismo de las cepas resistentes a 2-DG (lo que ocurre en los medios de cultivo M6 y M7). Esta estimulación no ocurrió en la serie de medios de cultivo que contenían almidón como fuente de carbono (M1, M2, y M3), excepto en la cepa UAT-PO4 que aumentó su velocidad de crecimiento específica en estos medios a 28 °C y 30 °C, en relación a 25 °C. La cepa que es más sensible a la 2-DG, la UAT-PO3, presentó este efecto estimulador de la μ_{cal} , ligeramente en el medio de cultivo que contenía glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), a temperatura de 28 °C y un efecto estimulador mayor en este medio a 30 °C, quizá este comportamiento es debido a que es una cepa que activa su metabolismo y producción de enzimas a mayor temperatura.

El análisis estadístico indicó que en los medios de cultivo que contenían; glucosa más 0.01 g/L de 2-DG (M6), almidón sin 2-DG (M1), glucosa sin de 2-DG (M5), glucosa más 0.1 g/L de 2-DG (M7), y almidón más 0.01 g/L de 2-DG (M2), presentaron las velocidades de

crecimiento específicas significativamente mayores, no presentando diferencias significativas entre sí. Los medios de cultivo que mostraron menor velocidad de crecimiento específica fueron los que contenían, glucosa más 1.0 g/L de 2-DG (M8) y almidón más 0.1 g/L de 2-DG (M3), presentando diferencias significativas entre sí. Por lo que respecta a el efecto de la temperatura sobre la μ_{cal} , no se presentaron diferencias significativas en las diferentes temperaturas experimentadas. Las cepas UAT-PO4 y UAT-PO7 son las que presentan significativamente mayor velocidad de crecimiento específica y la cepa UAT-PO3 menor μ_{cal} .

Estos resultados indican que para las cepas estudiadas la temperatura óptima para el desarrollo micelial era superior a 25 °C y probablemente cercana a 30 °C aunque no se tienen datos ciertos al respecto. Sin embargo se considera en la práctica industrial que es aconsejable tener la temperatura de producción por debajo de 30 °C (OLIVER y DELMAS, 1987). Cabría por lo tanto estudiar si durante el proceso de desarrollo micelial conviene aumentar un poco la temperatura para reducir el tiempo de fructificación.

Otro aspecto interesante del efecto de la temperatura sobre μ_{cal} fue observar que las cepas dgr UAT-PO4 y UAT-PO7 aumentaron su velocidad de crecimiento micelial con el aumento de la temperatura y que la cepa UAT-PO3 lo hizo en forma muy poco apreciable. Quizás las diferencias del fenotipo dgr y 2-DG sensible también estén asociadas a la capacidad de responder ante ligeros aumentos de temperatura, es decir que tengan una temperatura óptima más alta.

MEDIO DE CULTIVO	C E P A U T I L I Z A D A								
	UAT-PO3			UAT-PO4			UAT-PO7		
	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C
ALMIDON									
M1	267.73 ±14.33	220.67 ± 3.98	241.00 ± 3.79	319.65 ± 7.55	246.06 ± 7.38	263.48 ±12.00	310.40 ±11.62	276.58 ±11.50	283.54 ± 9.68
M2	174.06 ±14.24	171.29 ±11.75	132.50 ± 6.67	300.44 ±13.79	238.83 ± 4.67	268.38 ± 7.49	256.56 ±21.94	231.96 ± 2.38	273.40 ± 4.92
M3	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	196.79 ±19.93	100.41 ± 0.42	83.38 ± 3.00	101.10 ± 4.58	110.90 ± 8.25	NO CRECIO
M4	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
GLUCOSA									
M5	261.85 ±86.20	203.11 ± 4.92	226.38 ± 3.83	264.10 ± 3.94	228.33 ± 7.83	226.19 ± 8.92	297.83 ±18.82	258.69 ± 2.88	289.15 ± 4.17
M6	248.85 ±11.13	221.73 ± 5.54	232.48 ± 4.54	278.81 ± 4.35	219.48 ± 4.95	234.60 ± 2.46	324.46 ±15.28	276.29 ± 3.83	301.06 ± 7.29
M7	221.46 ±13.46	154.40 ± 3.30	169.40 ± 3.43	295.48 ± 2.68	202.15 ± 3.35	225.79 ± 4.84	267.67 ±17.29	261.98 ± 9.64	266.88 ± 5.83
M8	57.88 ± 1.54	46.56 ± 0.67	41.29 ± 3.46	118.17 ± 3.02	62.94 ± 4.08	70.75 ± 1.83	89.79 ± 4.45	77.75 ± 5.92	118.25 ± 8.04

TABLA X. EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO RADIAL (u_r [=] $\mu\text{m/hr}$) DE *Pleurotus ostreatus* A DIFERENTES TEMPERATURAS.

MEDIO DE CULTIVO	C E P A U T I L I Z A D A								
	UAT-PO3			UAT-PO4			UAT-PO7		
	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C
ALMIDON									
M1	6.69 ± 0.58	5.30 ± 0.84	5.78 ± 0.82	7.11 ± 0.64	4.87 ± 1.03	6.04 ± 1.09	5.77 ± 0.87	6.31 ± 0.75	5.10 ± 0.38
M2	5.79 ± 0.67	5.86 ± 0.63	4.11 ± 0.58	4.80 ± 1.66	5.04 ± 0.84	6.48 ± 0.80	4.80 ± 0.94	5.86 ± 0.94	4.74 ± 0.77
M3	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	5.61 ± 1.48	4.27 ± 1.0	5.10 ± 0.58	4.16 ± 0.48	4.12 ± 0.58	NO CRECIO
M4	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
GLUCOSA									
M5	6.29 ± 0.58	4.26 ± 1.07	5.33 ± 0.59	4.51 ± 0.84	5.23 ± 0.71	6.07 ± 0.55	3.42 ± 0.40	6.66 ± 0.64	6.59 ± 0.73
M6	6.02 ± 0.82	5.71 ± 0.92	5.96 ± 0.50	7.13 ± 1.2	6.70 ± 0.98	6.11 ± 0.97	5.88 ± 0.92	6.73 ± 0.70	5.18 ± 1.04
M7	6.54 ± 0.52	5.21 ± 0.79	5.73 ± 0.89	6.84 ± 1.26	6.19 ± 0.94	6.83 ± 0.81	4.48 ± 0.43	7.68 ± 1.25	5.97 ± 0.83
M8	2.67 ± 0.45	3.27 ± 0.68	3.99 ± 0.45	5.47 ± 0.75	3.20 ± 0.54	5.27 ± 0.70	3.88 ± 0.76	3.68 ± 0.50	5.37 ± 0.69

TABLA XI. EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA SOBRE EL DIAMETRO DE LAS HIFAS DISTALES (Dhd [=] μm) DE *Pleurotus ostreatus* A DIFERENTES TEMPERATURAS.

MEDIO DE CULTIVO	C E P A U T I L I Z A D A								
	UAT-PO3			UAT-PO4			UAT-PO7		
	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C
ALMIDON									
M1	790.3 ± 178	618.9 ± 195	619.0 ± 126	754.4 ± 167	644.3 ± 157	640.3 ± 199	824.5 ± 213	723.8 ± 151	698.8 ± 144
M2	602.3 ± 139	628.8 ± 123	491.3 ± 106	790.0 ± 163	548.9 ± 105	554.7 ± 134	742.6 ± 154	666.8 ± 147	720.4 ± 142
M3	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	433.8 ± 117	534.2 ± 110	292.3 ± 83	536.3 ± 109	517.9 ± 96	NO CRECIO
M4	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
GLUCOSA									
M5	688.7 ± 131	592.3 ± 113	581.6 ± 130	805.3 ± 129	630.7 ± 136	540.7 ± 130	682.7 ± 127	703.5 ± 129	654.3 ± 160
M6	790.7 ± 227	654.6 ± 125	536.4 ± 113	700.7 ± 138	517.6 ± 120	546.1 ± 143	730.6 ± 128	663.8 ± 164	701.7 ± 162
M7	707.8 ± 123	627.1 ± 127	509.3 ± 116	792.2 ± 213	574.8 ± 169	614.8 ± 193	669.5 ± 128	626.6 ± 128	600.6 ± 153
M8	310.5 ± 76	224.5 ± 81	237.1 ± 61	521.9 ± 118	297.4 ± 81	316.2 ± 77	412.5 ± 84	359.5 ± 97	331.5 ± 84

TABLA XII. EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA SOBRE LA LONGITUD DE HIFAS DISTALES (Lhd [=] μ m) DE *Pleurotus ostreatus* A DIFERENTES TEMPERATURAS.

MEDIO DE CULTIVO	C E P A U T I L I Z A D A								
	UAT-PO3			UAT-PO4			UAT-PO7		
	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C
ALMIDON									
M1	0.01965	0.02073	0.02304	0.02512	0.02166	0.02440	0.02103	0.02230	0.02290
M2	0.01720	0.01612	0.01561	0.02068	0.02566	0.03001	0.01900	0.02030	0.02095
M3	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	0.02877	0.01078	0.01938	0.01075	0.01227	NO CRECIO
M4	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO	NO CRECIO
GLUCOSA									
M5	0.02240	0.01926	0.02295	0.01756	0.02091	0.02573	0.02288	0.02182	0.02657
M6	0.01787	0.01977	0.02648	0.02397	0.02690	0.02640	0.02550	0.02505	0.02422
M7	0.01848	0.01423	0.02050	0.02172	0.02144	0.02254	0.02214	0.02621	0.02664
M8	0.01085	0.01604	0.01173	0.01373	0.01290	0.01504	0.01290	0.01305	0.02381

TABLA XIII. EFECTO DE LA 2-DESOXIGLUCOSA SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ESPECIFICA (μ_{cal} [=] hr^{-1}), DE *Pleurotus ostreatus* A DIFERENTES TEMPERATURAS.

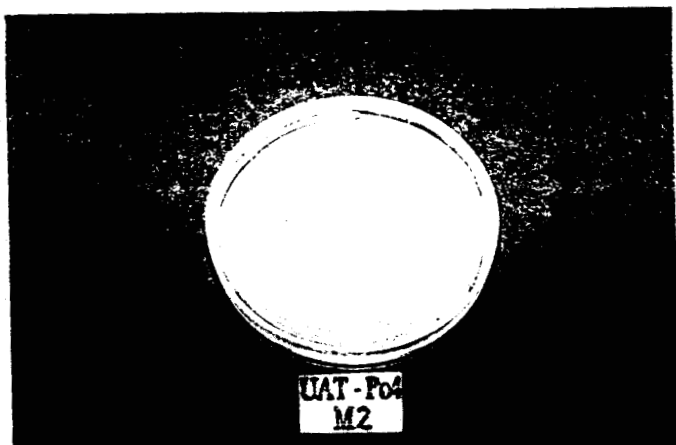


FIGURA 20. FRUCTIFICACION *IN VITRO* DE LA CEPA UAT-PO4, EN EL MEDIO DE CULTIVO M2.

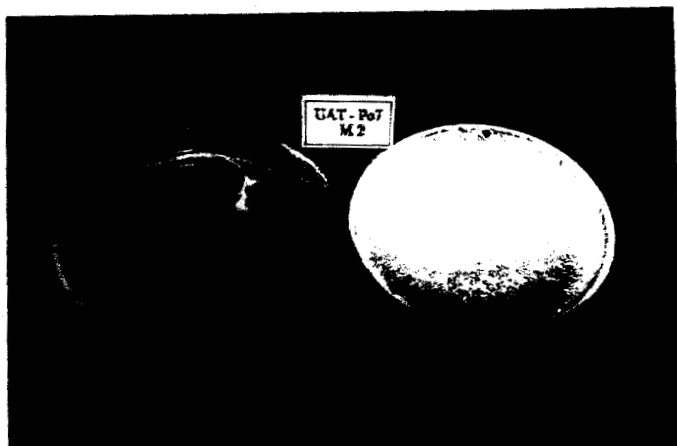


FIGURA 21. FRUCTIFICACION *IN VITRO* DE LA CEPA UAT-PO7, EN EL MEDIO DE CULTIVO M2.

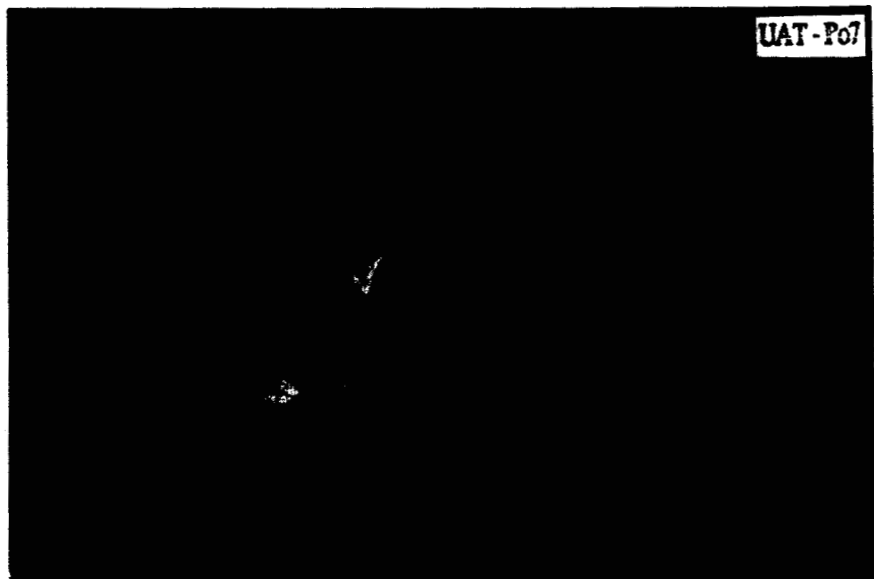


FIGURA 22. BASIDIOCARPO DE LA CEPA DE *P. ostreatus*, UAT-PO7.



FIGURA 23. BASIDIOCARPO DE LA CEPA DE *P. ostreatus*, UAT-PO4.



FIGURA 24. BASIDIOCARPO DE LA CEPA DE *P. ostreatus*, ATCC-38537.

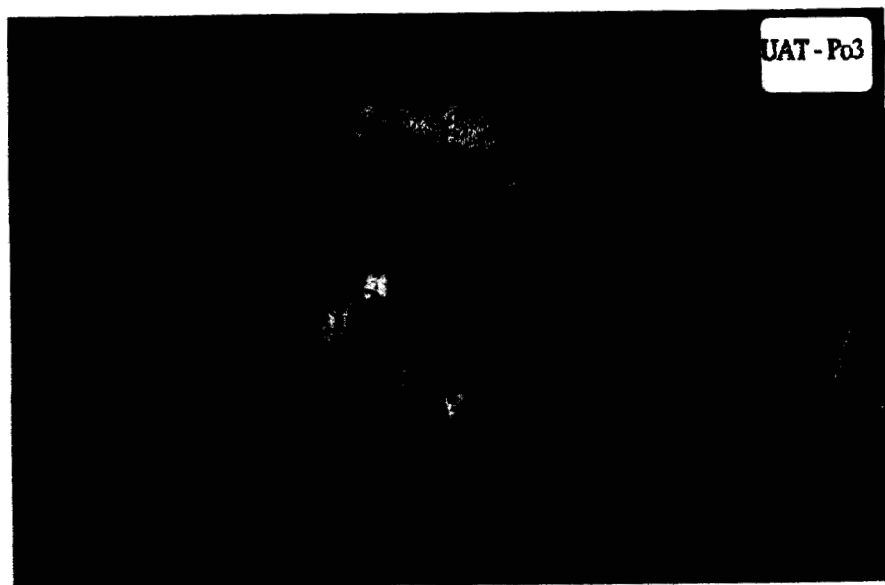


FIGURA 25. BASIDIOCARPO DE LA CEPA DE *P. ostreatus*, UAT-PO3.



FIGURA 26. BASIDIOCARPO DE LA CEPA DE *P. ostreatus*, ATCC-58052.



FIGURA 27. BASIDIOCARPO DE LA CEPA DE *P. ostreatus*, ATCC-32783.

7. CONCLUSIONES.

De las hipótesis originales se puede decir, en base a los resultados obtenidos;

1. La resistencia a la 2-DG parece estar parcialmente relacionada con un cierto tipo de modificación regulatoria de la fisiología de *Pleurotus ostreatus* porque las cepas que resultaron resistentes tuvieron la peculiaridad de acelerar su crecimiento con dosis subletales del análogo de azúcar, si la fuente de carbono era glucosa, pero que esta característica no es exclusiva del fenotipo dgr ya que una de las tres cepas sensibles a 2-DG también presentó esta característica. Sin embargo no hubo correlación evidente entre la velocidad de crecimiento o de consumo de azúcar y el fenotipo dgr, de manera que la primera hipótesis de este trabajo (pág. 36), no fue corroborada con el experimento.

2. No existió diferencia significativa entre la μ_{cal} obtenida en el medio de cultivo que contenía almidón en relación al medio que contenía glucosa (TABLA VII), con lo que no se demostró la validez de la segunda hipótesis.

3. Se pudo distinguir a simple vista a las cepas, ya que las dgr fueron las que crecieron en el medio de cultivo con almidón y 0.1 g/L de 2-DG (M3), de las otras que no crecieron (con lo que resulta cierta la tercera hipótesis), pero las diferencias en el tamaño de colonias, diámetro y longitud promedio de las hifas distales, no resultaron evidencias morfológicas muy distintivas.

4. La hipótesis cuarta, no pareció demostrarse de manera evidente, puesto que la resistencia a 2-DG no estuvo relacionada con μ_{cal} en ausencia del análogo. Lo que resultó interesante fue la demostración de la gran diferencia de

efectos que tuvo 2-DG sobre el micelio de *Pleurotus ostreatus*. Empleando como fuente de carbono almidón, la tendencia fue de disminuir μ_{cal} , pero con glucosa a veces el efecto fue estimulante a dosis subletales. Lo cual sugiere que la resistencia a 2-DG pudiera estar indirectamente relacionada con los mecanismos regulatorios de la inducción de amilasas.

Además del aspecto probatorio o urgatorio de esta tesis sobre las hipótesis aquí comentadas, cabe señalar que el resultado más importante, fue encontrar una clara relación entre la resistencia a 2-DG en concentraciones de 0.1 g/L usando almidón como sustrato y la mayor productividad de masa comestible (basidiocarpio) en la planta de producción. El análisis estadístico de estos resultados, mostró diferencias muy significativas e indicaron que las cepas con el fenotipo dgr tuvieron el doble de productividad medida en Kg de basidiocarpio fresco por tonelada de materia prima seca por día que las cepas sensibles (con lo que se cumplió el objetivo general).

El significado fisiológico de este hallazgo, esta aún por aclararse. Quizás, la 2-DG tenga que ver con el mecanismo de fructificación del micelio, por ser un análogo inductor del complejo de quitinasa y quitina sintetasa, como indicaron DE ROUSSET-HALL y GOODAY (1975), en el caso de la glucosamina (análogo tóxico de la glucosa) que a bajas concentraciones es un activador alosterico de la quitinsintetasa.

El hecho de que haya fenotipos tan distinguibles como el dgr, abre la posibilidad de realizar un programa de selección de cepas resistentes, a partir de las sensibles y a través de la caracterización de estas mutantes, se podría investigar que genes están involucrados con la regulación morfogénica y cuales serán sus posibles modos de acción.

Por otra parte los estudios sobre el rendimiento de biomasa y la sensibilidad a temperatura, ofrecen herramientas adicionales de caracterización en el laboratorio. Sobresale como resultado llamativo el elevado rendimiento experimental (caja Petri) de la cepa UAT-PO7.

No parece aún evidente, como se pueden relacionar todas estas diferencias fisiológicas del micelio con las de producción sobre el sustrato natural, no obstante este trabajo permite abrir una metodología accesible para el estudio fino de la fisiología de *Pleurotus ostreatus*, bajo condiciones controladas que quizás después tenga que ver con la producción de otros productos como metabolitos secundarios y enzimas que sería difíciles de estudiarse en los medios complejos naturales y que estarían demasiado alejados del medio sólido cuando se llevan a cabo en medio líquido agitado.

Por lo tanto se propone que la metodología aquí descrita sirva como base para estudios finos de la fisiología, la genética y la bioquímica de los hongos perfectos productores de basidiocarpo, que como se indicó anteriormente representan el mercado biotecnológico más grande para productos de alto valor agregado obtenidos del aprovechamiento de residuos lignocelulósicos a través de procesos de fermentación en estado sólido.

8. BIBLIOGRAFIA.

- ALLEN K. E., McNALLY M. T., LOWENDORF H. S., SLAYMAN C. W., FREE S. J. (1989). Deoxyglucose-resistant mutants of *Neurospora crassa*: Isolation, mapping, and biochemical characterization. *Journal of Bacteriology*, Jan. 53-59.
- BARTNICKI-GARCIA S., HERGERT F., GIERZ G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* 153:46-57.
- BAUM B. R., BAILEY L. G. (1987). A survey of endosperm starch granules in the genus *Hordeum*: a study using image analytic and numerical techniques. *Canadian Journal of Botany* 65:1563-1569.
- BETTS W. B., KING J. E. (1991). Oxidative coupling of 2,6 dimethoxyphenol by fungi and bacteria. *Mycol. Res.* 95:526-530.
- BLOCK S., TSAO G., HAN L. (1959). Experiments in the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mush. Sci.* 4:309-325.
- BOOMINATHAN K., ADINARAYANA R. (1992). Fungal degradation of lignin: Biotechnological Applications, in: *Handbook of Applied Mycology volume 4: Fungal Biotechnology*. Arora, Elander and Mukerji Eds. Marcel Dekker, Inc. 281-312.
- BORRIS H., (1934). Beitrage zur Wachstums-und Etwicklungsphysiologie der fruchtktorper von *Coprinus lagopus*. *Planta* 22:28-69.
- BUSSELL A. J. (1991). Fungal Degradation of lignin, in: *Handbook of Applied Mycology vol. 1: Soil and Plants*. Arora, Rai, Mukerji and Knudsen Eds. Marcel Dekker, Inc. 425-475.
- CHANDRA A., PURKAYASTHA R.P. (1977). Physiological studies on Indian edible mushrooms. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69:63-70.
- CRAIG G. D., WOOD D. A., GULL K. (1981). Chitin synthase in the stipe of *Agaricus bisporus* (J. Lange) Imbach. *FEMS Microbiology Letters* 10:43-47.
- DE ROUSSET-HALL A., GOODAY G. W. (1975). A kinetic study of a solubilized chitinsynthetasa preparation from *Coprinus cinereus*. *Journal of General Microbiology* 89:146-154.
- DURRANT A. J., WOOD D. A., CAIN R. B. (1991). Lignocellulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid substrate fermentation. *Journal of General Microbiology* 137:751-755.
- EGER G. 1978. Biology and Breeding of *Pleurotus*, in: *The biology and cultivation of Edible Mushrooms*. Chang S. T. and Hayes W. A. Eds. Academic Press. Inc. 497-517.

- EILERS F. I. (1974). Growth regulation in *Coprinus radiatus*. Arch. Microbiol. 96:353-364.
- ELISASHVILI V. I., GLONTI N. M., KACHLISHVILI E. T., KIKNADLE M. O., TUSISHVILI Kh. A. (1992). Screening of higher Basidiomycetes protein and enzyme producers. PRIKL. BIOKHM. MIKROBIOL. 28(3):362-366.
- ELLIOT T. J. (1985). Developmental genetics-from spore to sporophore. In: Developmental biology of higher fungi. MOORE D., CASSELTON L. A., WOOD D. A., FLANKLAND J. C., EDS. Cambridge University Press. 451-465.
- GALPIN M.F.J., JENNINGS D. H., THORNTON J.D. (1977). Hyphal branching in *Dendryphiella salina*: Effect of various compounds and the further elucidation of the effect of sorbose and the role of cyclic AMP. Trans. Br. Mycol. Soc. 69(2):175-182.
- GHOSH A. K., SENGUPTA S. (1976). Studies on biochemistry of higher fungi. I. Submerged growth of *Volvariella volvacea* in synthetic medium. J. Fd. Sci. Technol. 14:6-10.
- GLASER L., BROWN D. H. (1957). The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 228:729-742.
- GONZALEZ-BLANCO P.C., LARRALDE-CORONA P., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1993). Image processing technique for measuring specific growth rates of *Gibberella fujikuroi*. Biotech. Tech. 7(1):57-62.
- GOODAY G. W. (1972). The role of chitin synthetase in the elongation of fruit bodies of *Coprinus cinereus*. Journal of General Microbiology 73, xxi.
- GOODAY G. W. (1973). Activity of chitin synthetase during the development of fruit bodies of *Coprinus cinereus*. Biochemical Society Transactions 1:1105-1107.
- GOODAY G.W. (1974). Control of development of excised fruit bodies and stipes of *Coprinus cinereus*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 62:391-399.
- GOODAY G. W. (1975). The control of differentiation in fruit bodies of *Coprinus cinereus*. Rept. Tottori Mycol. Inst. (Japan) 12:151-160.
- GOPTA V.K. (1979). Studies on growth of mushroom mycelia as a source of microbial protein from edible mushroom species occurring in; Punjab state Ph. D. thesis submitted to PAU, Ludhiana, India, 159 pag.
- GRISAN E., SANDS A. (1978). Nutricional Value, in: The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. Chang, y Hayes Eds. Academic Press.

GUHA A. K., BANERJEE A. B. (1971). Effect of different carbon compounds on submerged production of *Agaricus campestris* mycelium. J. Fd. Sci. Technol. 8:82-83.

GUINBERTEAU J. (1990). Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushroom classification. Bulletin de la Federation Nationale des Syndiats Agricoles de Cultivateurs de Champignons (France) 48:261-264.

HACSKAYLO J., LILLY V. G., BARNETT H.I. (1954). Growth of fungi on three sources of N. Mycologia 46:691-701.

HADAR Y., COHEN-ARAZI A. (1986). Chemical Composition of the Edible Mushrooms *Pleurotus ostreatus* Produced by Fermentation. Applied and Environmental Microbiology 51(6):1352-1354.

HAGIMOTO H. (1964). On the growth of the fruit body of *Agaricus bisporus* (LANGE). Sing. Trans. Mycol. Soc. Japan 4:158-164.

HAGIMOTO H., KONICHI M. (1959). Studies on the growth of fruit body of fungi I. Existence of a hormone active to the growth of fruit body in *Agaricus bisporus* (LANGE). Sing. Bot. Mag. Tokyo 72:359-366.

HAMMAD F., JI J., WATLING R., MOORE D. (1993). Cell population dynamics in *Coprinus cinereus*: Co-ordination of cell inflation throughout the maturing basidiome. Mycol. Res. 97(3):269-274.

HASHIMOTO K., TAKAHASHI Z. (1974). Studies on the growth of *Pleurotus flabellatus*. Mush. Sci. 9:585-598.

HAWKSWORTH D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycol. Res. 95(6): 641-655.

HEREDIA C. F., DE LA FUENTE G., SOLS A. (1964) Metabolic studies with 2-deoxyhexoses. I mechanisms of inhibition of growth and fermentation in baker's yeast. Biochim. Biophys. Acta 86:216-223.

HEREDIA C. F., SOLS A. (1964) Metabolic studies with 2-deoxyhexoses. II resistance to 2-deoxyglucose in yeast mutant. Biochim. Biophys. Acta 86:224-228.

HIGUCHI T. (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. Wood Sci. Technol. 24:23-63.

HOW Y., MOORE D. (1992). Convenient and effective methods for in vitro cultivation of mycelium and fruiting bodies of *Lentinus edodes*. Mycol. Res. 96(12):1077-1084.

HSING-HSIUNG H., LUNG-CHI W., CHANG-CHEN C. (1974). Respiratory pathways of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Mushroom Science IX (part II) , Proceedings of the Ninth

International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi, Toipei. China, pag. 37-46.

ISHIKAWA T., UNO I. (1977). A mechanism of fruiting body formation in basidiomycetes In: Growth and differentiation in microorganisms. Ishikawa, Maruyama and Matsumiya Eds. University Park Press. Balt. 283 pag.

JANDAİK C.L., KAPOOR J. N. (1976). Effect of carbon and nitrogen nutrition on growth of *Pleurotus sajor-caju*. Indian Phytopathol. 29:326-327.

JOLY P., JOLY F., BUI-THU-CUC. (1971). Essais d'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. VI. Étude cinétique de la croissance mycélienne chez les champignons. Bull. Soc. Myc. Fr. 87(4):657-674.

KAMADA T., TAKEMARU T. (1977). Stipe elongation during basidiocarp maturation in *Coprinus macrorhizus*: mechanical properties of stipe cell wall. Plant cell Physiology 18:831-840.

KAMADA T., TAKEMARU T. (1983). Modifications of cell wall polysaccharides during stipe elongation in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. Journal of General Microbiology 129, 703-709.

KAUL T. N. (1977). Physiological studies on *Morchella* species. II Nitrogen utilisation. The Mush. J. 58:1-6.

KHANNA P., GARCHA H. S. (1985a). Physiological studies on *Pleurotus* spp. I Nitrogen utilisation. Mush. Newsletter for the tropics 5(3):16-19.

KHANNA P., GARCHA H. S. (1985b). Physiological studies on *Pleurotus* spp. II Carbon utilisation. Mush. Newsletter for the tropics 6(1):8-14.

KIMURA K., FUGIO M. (1961). Studies on abnormal fruit-bodies of the hymenomycetous fungi. I. Undeveloped fruit bodies of *Coprinus macrorhizus* f. *microsporus*. Rept. Tottori Mycol. Inst. (Japan) 12:151-160.

KLIOUSHNIKOV E., WIATKINA A., WASSILIEN A., ZUKERMAN P. (1935). Mushroom culture. Kinds of manure, races of *Psalliota campestris* and spore germination. Wiss. Ber. Moskaver Staatsuniversitat 4:216-265.

KOCK W. (1958). Untersuchungen über mycelwachstum und fruchtkörperbildung bei einigen Basidiomycetes. (*Polystictus versicolor*, *Polyporus annosus*, *Pleurotus ostreatus* und *Psalliota bispora*). Arch. Mikrobiol. 30:409-432.

LABORDE J. (1987). Propositions pour une amélioration de la culture des Pleurotes. Revue Horticole, 13-20.

- LABORDE J. (1988). Le champignon de la nouvelle cuisine. INRA, France.
- LARRALDE P., GONZALEZ-BLANCO P.C., VINIEGRA G. (1994). Comparison of alternative kinetic models for estimating the specific growth of *Gibberella fujikuroi* by image analysis techniques. *Biotechnology Technique* 8(4): 261-266.
- LARRALDE-CORONA C. P. (1992). Acoplamiento energético en la germinación de *Aspergillus niger* CH4. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. UAM-Iztapalapa.
- LEONIAN L. H., LILLY V.G. (1938). Studies on the nutrition of fungi. I. Thiamin, its constituents and the source of nitrogen. *Phytopath.* 28:531-548.
- LEONIAN L. H., LILLY V.G. (1940). Studies on the nutrition of fungi. IV. Factors influencing the growth of some thiamin-requiring fungi. *Amer. J. Bot.* 27:18-26.
- LILLY V.G., BARNETT H.L. (1951). *Physiology of the fungi*. Mc Graw Hill Book Co. Inc. N.Y., 464 p.
- LU B. C. (1974). Meiosis in *Coprinus*. V. The role of light on basidiocarp initiation, mitosis and hymenium differentiation in *Coprinus lagopus*. *Canadian Journal of Botany* 52:299-306.
- MACAYA-LIZANO A.V. (1975). *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Quélet, formes et especes affines. Comportement cultural et systématique. *Revue de Mycologie M.N.H.N., Paris*. Tomo 39: 1-57.
- MANDELS G.R. (1965). Kinetics of fungal growth, (in Ainsworth and Sussman), *The Fungi* T. 1:599-612.
- MANU-TAWIAH W., MARTIN A.M., (1988). Nitrogen sources and the growth response of *Pleurotus ostreatus* mycelium. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 21(2):194-199.
- MARKHAM P., BAZIN M. J. (1991). Decomposition of cellulose by fungi, In: *Handbook of Applied Mycology, Volume 1: Soil and Plants*. Arora, Rai, Mukerji and Knudsen Eds. Marcel Denkker, Inc. 379-424.
- MARTIN M., HEREDIA C. F. (1977). Characterization of a Phosphatase specific for 2-deoxyglucose-6-phosphate in a yeast mutant. *FEBS Letters* 83(2):245-248.
- MARTINEZ-CARRERA D., LARQUE-SAAVEDRA A., MORALES P., SOBAL M., MARTINEZ W., AGUILAR A. (1993). Los hongos comestibles en México: biotecnología de su reproducción. *Ciencia y Desarrollo*. Vol. XVIII, 108:41-49.
- MILLER G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.* 31:426-428.

- MILSTEIN O., HAARS A., MASCHERCZYK A., TROJANOWSKI J., TAUTZ D., ZANKER H., HUTTERMANN A. (1988). Removal of chlorophenols and chlorolignins from bleaching effluent by combined chemical and biological treatment. *Water Sci. Technol.* 20:161-170.
- MOORE D. (1968). The effect of 2-deoxy-D-glucose on the growth and respiration of *Coprinus lagopus*. *Journal of General Microbiology* 52:433-439.
- MOORE D. (1969). Effects of 2-deoxy-D-glucose on mycelial growth of filamentous fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 53:139-141.
- MOORE D. (1973). Mutants of *Coprinus* selected for resistance to D-glucosamine and L-sorbose. *Genetical Research* 22:205-209.
- MOORE D. (1981). Effects of hexose analogues on fungi: mechanisms of inhibition and of resistance. *New Phytol.* 87:487-515.
- MOORE D. (1984). Developmental biology of the *Coprinus cinereus* carpophore: Metabolic regulation in relation to cap morphogenesis. *Experimental Mycology* 8:283-297.
- MOORE D. (1993). Control of pattern and form in mushroom morphogenesis. In: *Proceedings, First International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. S. T. Chang, J.A. Buswell and S.W. Chiu. pp.33-39.
- MOORE D. (1994). Tissue formation. In: *The growing fungus*. GOW R. N. A. AND GADD G. M. , EDS. Chapman-Hall. Chapter 21, in press.
- MOORE D., DEVADATHAM M. S. (1979). Sugar transport in *Coprinus cinereus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 550:515-526.
- MOORE D., ELHITI M. M., BUTLER R. D. (1979a). Morphogenesis of the carpophore of *Coprinus cinereus*. *New Phytologist* 83:695-722.
- MOORE D., STEWART G. R. (1971). Mutants of *Coprinus lagopus* selected for resistance to 2-deoxy-D-glucose. *Genetical Research* 18:341-352.
- MOORE D., STEWART G. R. (1972). Effects of 2-deoxy-D-glucose, D-glucosamina, and L-sorbose on the growth of *Coprinus lagopus* hyphae. *Journal of General Microbiology* 71:333-342.
- OLIVIER J. M., DELMAS J. (1987). Vers la Maîtrise des Champignons Comestibles. *Biofutur* 23-41.
- PACKER H. L., THOMAS C. R. (1990). Morphological measurement on filamentous microorganisms by full automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 37:870-881.

- PIRT S. J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. 1st Ed. Edit. Blackweel Scientific Publications. USA.
- PLOMLEY N.J.B. (1959). Formation of the colony in the fungus *Chaetomium*. Aust. J. Biol. Sci. 12:53-64.
- RAI R.D., SAXENA S., UPADHYAY R.C., SOHI H.S. (1988). Comparative nutritional value of various *Pleurotus* species grown under identical conditions. Mush. J. Tropics. 8:93-98.
- RAPER J. R. (1966). Genetics of sexuality in higher fungi. Ronald Press, N. Y.
- RAPER J.R., KONGELB G. (1958). Genetic and environmental aspects of fruiting in *Schizophyllum commune*. Mycologia 30:707.
- ROLZ C., DE LEON R., DE ARRIOLA M.C., DE CABRERA S. (1986). Biodelignification of lemon grass and citronella bagasse by white-rot fungi. Applied and Environmental Microbiology 607-611.
- RUIZ-HERRERA J. (1982). Synthesis of chitin microfibrils in vitro, in: Cellulose and other Natural Polymer Systems. Brown, R. M. Ed. Plenum Press. 207-223.
- RUIZ-HERRERA J., SENTANDREU R. R., MARTINEZ P. (1992). Chitin Biosynthesis in fungi, in: Handbook of Applied Mycology Volume 4: Fungal Biotechnology. Arora, Elander, and Mukerji Eds. Marcel Denkker, Inc. 281-312.
- SANNIA G., LIMONGI G. P., COCCA E., BVONOCORE F., NITTI G., GIARDINA P. (1991). Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Biochim. Biophys. Acta 1073:114-119.
- SCHWALB M.N. (1974). Effect of adenosine 3', 5'- cyclic monophosphate on the morphogenesis of fruit bodies of *Schizophyllum commune*. Arch. Microbiol. 96:17.
- SCHWALB M.N. (1978). Regulation of fruiting, In: Genetics and Morphogenesis in the Basidiomycetes. Academic Press. Schwalb and Miles Eds. 168 pag.
- SOHI H.S., UPADHYAY R.C. 1989. Effect of temperature on mycelial growth of *Pleurotus* species and their yield performance on selected substrates. Proceedings of the twelfth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. 49-57.
- SRIVASTARA H. C., BANO Z. (1970). Nutritional requirements of *Pleurotus flabellatus*. Appl. Microbiol. 19:166-169.
- STAHL U., ESSER K. (1977). Genetics on fruit body production in higher basidiomycetes. I. MonoKaryotic fruitings and its correlation with dikaryotic fruiting in *Polyporus ciliatus*. Molec. Gen. Genet. 148:183.

STEINBERG R. A. (1939). Growth of fungi in synthetic nutrient solutions. Bot. Rev. 5:327-350.

STEPHENSON N. A., GOODAY G. W. (1984). Nuclear numbers in the stipes cells of *Coprinus cinereus*. Transactions of the British Mycological Society 82:531-534.

TAJ-ALDEEN S. J., MOORE D. (1983). Evidence for a single hexokinase in *Coprinus cinereus*. FEMS Microbiology Letters 17:73-75.

TAKEMARU T., KAMADA T. (1969). The induction of morphogenetic variation in *Coprinus basidiocarps* by U.V. irradiation. Rept. Tottori Mycol. Inst. (Japan) 7:71-77.

TAKEMARU T., KAMADA T. (1970). Genetic analysis of U.V. induced, developmental and expansionics. Ibid. 8:11-16.

TAKEMARU T., KAMADA T. (1972). Basidiocarp development in *Coprinus macrorhizus* I. Induction of developmental variations. Bog. Mag. Tokyo 85:51-57.

TAKEMARU T., KAMADA T., MUKARAMI S. (1974). A comment on the genomal condition for basidiocarp development. Proc. 1st Intersect. Congress. Internat. Ass. Microbiol. Soc., Tokyo.

TATUM E.L., BARRATT R. W., CUTTER V. M. (1949). chemical induction of colonial paramorphs in *Neurospora* and *Syncephalastrum*. Science 109:509-511.

TRESCHOW C. (1944). Nutrition of the cultivated mushroom. Danskbot. Arkiv. 11:180.

TRINCI A. P. J. (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. J. Gen. Microbiol. 56:11-24.

TRINCI A. P. J. (1974). A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. J. Gen. Microbiol. 81:225-236.

TRINCI A. P. J., COLLINGE A. J. (1973). Influence of L-sorbose on the growth and morphology of *Neurospora crassa*. Journal of General Microbiology 78:179-192

TSAO G.T. (1963). Production of oxalic acid by wood-rotting fungus. Appl. Microbiol. 11:249-255.

VAN DE VOOREN J. G., POLDER G., VAN DER HEIJDEN G. W. A. M. (1991). Application of image analysis for variety testing of mushroom. Euphytica 57:245-250.

VAN DE VOOREN J. G., POLDER G., VAN DER HEIJDEN G. W. A. M. (1992). Identification of mushroom cultivars using image analysis. *Transactions of the ASAE* 35(1):347-351.

VAN DER NEUT A. (1991). The development of a set of characteristics for D.V.S. test of cultivated mushroom varieties. in: *Proc. First International Seminar on Mushroom Science*, Van Griensven L. J. L. D. Ed., 153-160. Pudoc, Wageningen.

VINIEGRA-GONZALEZ G., MINJARES A., LOERA O., SANCHEZ-HERNANDEZ M.C., AGUIRRE J. (1993a). Evaluación morfológica de cepas de hongos resistentes a la desoxiglucosa. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería* A. C. 3(5y6):S93-S102.

VINIEGRA-GONZALEZ G., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LOPEZ-ISUNZA F., FAVELA-TORRES E. (1993b). Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. *Biotech. Bioeng.* 42:1-10.

VOLTZ P. A. (1972). Nutritional studies on species and mutants of *Lepista*, *Cantharellus*, *Pleurotus* and *Volvariella*. *Mycopath. et Myc. Appl.* 48:175-185.

WEBSTER J. (1980). *Introduction to fungi*, Alden Press 2da. ed. Gran Bretaña.

WESSELS J. G. H., MOL P. C., SIETSMA J. H., VERMEULEN C. A. (1990). Wall Structure, Wall Growth, and Fungal Cell Morphogenesis, in: *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*. Kuhn, Trinci, Jung and Copping Eds. Springer-Verlag. 82-95.

WOOD D. A. (1985). Useful biodegradation of lignocellulose. In: *Plant products and the new technology*. FULLER K. W. AND GALLON J. R. EDS. Clarendon Press, 295-305.

WOOD D. A. (1989). Mushroom biotechnology. *International Industrial Biotechnology* 9:5-8.

YUSEF H. M., ALLAM M. (1967). The carbon and nitrogen nutrition of certain fungi. *Can. J. Microbiol.* 13(8):1097-1106.

ZADRAZIL F. (1978). Cultivation of *Pleurotus*, in: *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Chang and Hayes Eds. Academic Press. 819.

ZOHAR K., DANA F., YITZHAK H. (1992). Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1121-1127.

ZONNEVELD B. J. M. (1973). Inhibitory effects of 2-deoxyglucose on cell wall 1,3-glucan synthesis and cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology*. 34:1-8