



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y POSGRADO DEL C. C. H.

PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE CEPAS  
DE *Pleurotus ostreatus* CAPACES DE PRODUCIR UNA  
DEGRADACION SELECTIVA DE LA LIGNOCELULOSA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRIA EN CIENCIAS**  
**P R E S E N T A :**  
**REBECA RAMIREZ CARRILLO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

	Páginas
RESUMEN	
I INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	1
II MATERIALES Y METODOS	17
2.1 CEPAS FUNGICAS.	17
2.1.1 Cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizadas para producir mutantes acelulolíticas (C-).	17
2.1.2 Cepas monocarióticas de <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizadas para el mejoramiento genético.	18
2.2 MEDIOS UTILIZADOS PARA EL DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE LAS CEPAS.	18
2.2.1 Extracto de malta.	18
2.2.2 Extracto de malta deproteinado (DPMA).	19
2.2.3 Agar-agua.	19
2.2.4 Sales minerales (primera capa)	20
2.2.5 Carboximetil celulosa (segunda capa)	20
2.2.6 Agar papel filtro.	22
2.2.7 Peptona al 0.05 y 0.1%.	23
2.2.8 Agar-paja.	24
2.3 CONDICIONES PARA PRODUCIR MUTANTES ACELULOLITICAS (C-).	25
2.3.1 Fragmentación del micelio monocariótico.	25
2.3.2 Obtención de basidiosporas.	25
2.3.3 Metodología de mutación.	27
2.3.4 Metodología para la recuperación de mutantes acelulolíticas.	27
2.4 MEJORAMIENTO GENETICO.	28
2.4.1 Hibridización de cepas monocarióticas.	28
2.4.2 Germinación de esporas y aislamiento de monocariotes.	29
2.5 EVALUACION DE LOS PATRONES DE CONSUMO DE LOS DICARIOTES ACELULOLITICOS SOBRE PAJA DE TRIGO.	29
2.5.1 Producción del inóculo de grano.	29
2.5.2 Acondicionamiento e inoculación de la paja de trigo.	30

2.5.3	Determinaciones analíticas.	31
2.5.3.1	Cenizas.	31
2.5.3.2	Lignina.	31
2.5.3.3	Extracción de carbohidratos.	32
2.5.3.4	Determinación de glucanos.	33
2.5.3.5	Determinación de xilanos.	34
<b>III</b>	<b>EXPERIMENTOS Y RESULTADOS</b>	<b>36</b>
3.1	DEFINICION DE LAS CONDICIONES PARA PRODUCIR MUTANTES ACELULOLITICAS (C-).	36
3.1.1	Condiciones de mutación para micelio monocariótico.	37
3.1.2	Condiciones de mutación para basidiosporas.	40
3.2	PRODUCCION DE MUTANTES ACELULOLITICAS (C-).	42
3.2.1	Experimentos de mutación con micelio monocariótico.	42
3.2.2	Experimentos de mutación con basidiosporas.	44
3.3	CARACTERIZACION DE LAS POSIBLES MUTANTES ACELULOLITICAS (C-).	45
3.3.1	Evaluación del carácter (C-) por resiembras sucesivas en el medio de recuperación.	45
3.3.2	Evaluación del carácter (C-) modificando el medio de recuperación en la primera capa.	47
3.3.3	Evaluación del carácter (C-) modificando la fuente de celulosa.	49
3.4	SELECCION DE LAS CEPAS A MEJORAR GENETICAMENTE.	50
3.4.1	Selección del monocariote silvestre.	51
3.5	MEJORAMIENTO GENETICO.	53
3.5.1	Obtención de la progenie.	53
3.5.2	Selección de monocariotes progenie de tipo (C-).	54
3.5.3	Definición del número de genes involucrados en el carácter (C-).	55
3.5.4	Determinación de tipos de compatibilidad de la progenie (C-).	58
3.5.5	Apareamientos entre monocariotes compatibles con diferente capacidad para consumir celulosa.	59
3.5.6	Selección de dicariotes (C-).	60

3.6	COMPORTAMIENTO DE LOS DICARIOTES (C-) SOBRE PAJA DE TRIGO.	61
3.6.1	Evaluación comparativa del desarrollo miceliar en medio de peptona y paja.	62
3.6.2	Propagación de los dicariotes (C-) en paja de trigo.	63
3.6.3	Evaluación química de los patrones de consumo de los dicariotes (C-) sobre paja de trigo.	64
IV	DISCUSION	70
V	CONCLUSIONES	81
VI	ANEXOS	85
VII	BIBLIOGRAFIA	90

## RESUMEN

La lignina representa una barrera para el uso eficiente de los desperdicios lignocelulósicos, debido a que en estos materiales se encuentra asociada a la celulosa y hemicelulosa. Existen muy pocos microorganismos capaces de atacar a la lignina, pero desafortunadamente en estos casos los polisacáridos también son degradados. Se han tratado de obtener cepas que degraden selectivamente a la lignina para dejar disponibles a los polisacáridos, llegándose inclusive a obtener una mutante acelulolítica del hongo de la pudrición blanca *S. pulverulentus* degradadora de lignina. Sin embargo, no se ha desarrollado un proceso industrial de delignificación, debido en parte a que se ha trabajado con hongos genéticamente poco conocidos.

El objetivo del presente trabajo consistió en obtener cepas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva en la lignocelulosa. Para ello, primero se produjeron mutantes de *P. ostreatus* utilizando N-metil-N'-nitro N-nitroso guanidina (MNNO) y se logró recuperar una mutante acelulolítica total. Esta mutante se mejoró genéticamente por hibridización para estudiar su descendencia y conocer el número de genes involucrados en el carácter (C-). Dicha descendencia se hibridizó nuevamente para obtener cepas dicarióticas y seleccionar las de tipo (C-). Finalmente, se determinaron los patrones de consumo de 11 dicariotes (C-) y 2 cepas testigo. Se encontró que una de las cepas consumió un 46% de lignina y tan sólo un 30% de celulosa, en comparación con las cepas testigo que consumen entre 41 y 44% de celulosa y de 44 a 48% de lignina.

## I INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

La utilización de los desperdicios agrícolas en los países en vías de desarrollo por medio de tecnologías que permitan aumentar la producción de alimentos básicos, adquiere una importancia cada día mayor. La productividad agrícola en estos países esta caracterizada por rendimientos muy inferiores a los obtenidos por los países industrializados (DGAF, 1983), lo que aunado a las altas tasas de crecimiento demográfico ha causado un deterioro gradual de su situación alimentaria. Así, estos países se encuentran importando cantidades considerables de productos alimenticios para cubrir sus necesidades básicas.

Por otro lado con la mayoría de los cultivos agrícolas, sólo se cosecha un 30% de la biomasa total producida y las pérdidas del material cosechado se acercan a un 50% (Stanton, 1977); mientras que con la actividad forestal, la proporción de biomasa desperdiciada es todavía mucho mayor. Esto significa que con la mayor parte de los cultivos en promedio, la mitad de la biomasa total producida permanece desaprovechada (Markhijani y Poole, 1975) y periódicamente se acumulan cantidades considerables de desperdicios vegetales a causa del carácter intensivo - periódico de la agricultura.

Debido a que los procesos de degradación natural no pueden funcionar efectivamente en las situaciones en que son producidos y acumulados los desperdicios agrícolas y forestales, éstos han llegado inclusive a convertirse en un peligro para el equilibrio ecológico. La implementación de tecnologías que puedan usar estos

materiales de desecho para aumentar la producción de alimentos básicos es de interés primordial. Esto no únicamente resolvería los problemas ecológicos causados por la acumulación de grandes cantidades de desechos, sino que aumentaría el rendimiento económico de la agricultura.

Los alcances de una tecnología efectiva para el aprovechamiento de los desperdicios agrícolas, serían todavía mucho mayores, ya que por este medio se tendrá acceso a los vastos productos vegetales generados continuamente como resultado de la actividad fotosintética de las plantas, permitiendo su utilización más completa y racional. El volumen de estos recursos es muy considerable, ya que la biomasa total producida fotosintéticamente sobre la superficie terrestre se calcula que sobrepasa las 10<sup>10</sup> toneladas/año (Walton y Blackwell, 1973). De esta biomasa sólo el 10% es sintetizada por los cultivos agrícolas y la mayor parte de ella (75%) es producida en las zonas boscosas (Bassham, 1975).

Los volúmenes enormes de estos recursos ha motivado la realización de numerosas investigaciones orientadas hacia el desarrollo de tecnologías para su aprovechamiento. Haciendo una similitud con otras áreas de la industria química y biotecnológica, se han tratado de desarrollar procesos para utilizar estos materiales en la producción de proteína unicelular (PUC) a escala industrial. Para ello, se diseñaron plantas de capacidades gigantescas con tecnología sumamente complicada y costosa (Mateles y Tannenbaum, 1968; Callihan y Dunlap, 1971;

Tannenbaum y Wang, 1975).

No obstante el interés en esta área, no se ha logrado desarrollar hasta la fecha un proceso práctico debido a que no se han considerado varios factores de suma importancia. Uno de ellos es el carácter disperso con que se producen estos desechos, lo que aunado a su baja densidad, ocasiona que los costos de transporte se conviertan en una de las variables más importantes que afectan a la economía del proceso. Este factor es todavía de mayor importancia al considerar plantas de gran capacidad donde se tienen que transportar grandes cantidades de sustrato, es decir, al seguir el enfoque de llevar el sustrato al proceso.

Dada la dispersión con que son generados los desechos agrícolas, la implementación de un proyecto viable requiere posiblemente de un cambio de enfoque: siendo tal vez necesario llevar el proceso al sustrato. Para esto se requiere de una tecnología susceptible de ser implementada en pequeños módulos en el campo después de la cosecha. Además, tal tecnología debe ser simple, de fácil operación y requerir de poco capital. Las repercusiones socioeconómicas de tal tecnología serían sumamente positivas para el medio rural, ya que los mismos campesinos podrían procesar los desechos de sus cosechas permitiéndoles ocuparse en una actividad económicamente redituable durante el periodo entre las cosechas. Desde este punto de vista, las tecnologías de gran escala son también desfavorables, ya que crean relativamente muy pocas fuentes de trabajo en comparación con las grandes inversiones. Además, la mano de obra empleada debe tener cierta especialización debido al alto grado de

complicación tecnológica de tales procesos.

Otra de las razones que han contribuido al fracaso de las tecnologías desarrolladas para el aprovechamiento de los desperdicios agrícolas lo constituye el enfoque unilateral con el cual ha sido atacado el problema de los desperdicios vegetales. Estos materiales están compuestos principalmente de tres tipos de biopolímeros: hemicelulosa, celulosa y lignina, por lo que también se les conoce como lignocelulósicos. No obstante lo anterior, únicamente se ha estudiado el problema en términos de la degradación biológica o química de los polisacáridos, principalmente la celulosa (Wilkie, 1975). Aunado a esto, se ha adoptado el planteamiento meramente bioquímico de hacer un componente, en este caso la celulosa, más fácilmente accesible a un sistema enzimático, las celulasas. El objetivo seguido ha sido degradar la celulosa de los desechos lignocelulósicos para la liberación de azúcares. En un siguiente paso, estos azúcares son utilizados como fuente energética por microorganismos para producir proteína unicelular (PUC) (Wilkie, 1975).

La inoperabilidad económica de este esquema se debe a que no obstante la celulosa está presente en un alto porcentaje en los tejidos vegetales, la lignina se encuentra íntimamente unida a la celulosa y hemicelulosa en las paredes celulares (Cote, 1977). Los polisacáridos vegetales son protegidos en esta forma por la lignina contra el ataque microbiano (Kirk, 1977), por lo que sólo una parte de ellos es susceptible a la degradación biológica o química. Esto es consecuencia de que la mayor parte de los

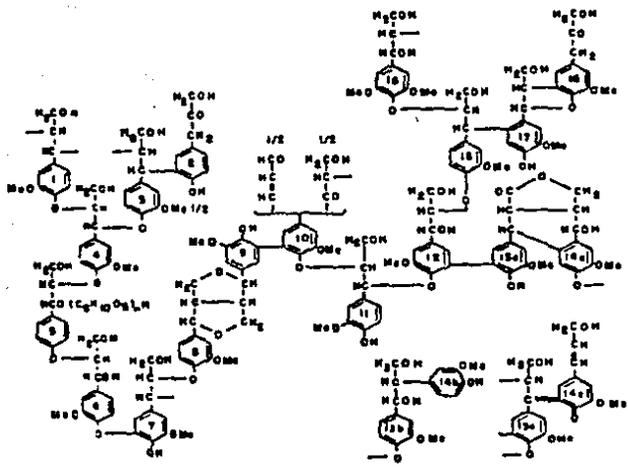


Fig. 1.1. MODELO ESQUEMATICO DE LA LIGNINA DE ABETO (Freudentberg, 1968).

microorganismos degradadores de polisacáridos no son capaces de atacar sustancialmente a los tejidos vegetales fibrosos a menos que también posean actividad ligninolítica.

La lignina es un polímero estructural de las plantas vasculares, formada por unidades de fenil propano. Por su estructura proporciona a las plantas rigidez y unión entre sus células. De acuerdo a la definición de Sarkanen y Ludwig, la lignina es un polímero natural formado por la polimerización de tres precursores primarios; alcohol-trans-para-cumérico, alcohol-trans-coniferílico y alcohol-trans-sinápico. Por ello, la molécula de lignina presenta una estructura ramificada irregular (Fig. 1.1)

La asociación íntima de la lignina con la celulosa representa también un obstáculo para la utilización directa de los desechos lignocelulósicos en la alimentación animal. No obstante que la celulosa puede ser utilizada como fuente de energía por los rumiantes, la lignina también presente en los desechos vegetales impide que sean usados como forrajes, ya que su digestibilidad disminuye conforme aumenta el contenido de lignina (Kirk y Moore, 1972).

Las consideraciones anteriores subrayan la importancia de la lignina, ya que este polímero no únicamente representa una fuente de carbono orgánico considerable, sino que se encuentra controlando la degradación de una gran parte de los polisacáridos vegetales. Se puede establecer sin lugar a dudas, que la lignina constituye el obstáculo más serio para el desarrollo exitoso de

procesos para la utilización de desperdicios vegetales.

Los argumentos mencionados permiten visualizar la conveniencia del desarrollo de un proceso de delignificación que se pueda implementar a nivel rural. Se han realizado numerosas investigaciones sobre la delignificación de desperdicios vegetales, por métodos físicos (tratamientos físicos, moliendas de varios tipos, radiaciones) o con la ayuda de sustancias químicas alcalinas como:  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NaOH}$  y  $\text{NH}_4$  entre otros (Han y Callihan, 1974; McManus, 1976). Por medio de estos tratamientos, solos o en combinación, es posible disminuir el contenido de lignina de los desperdicios lignocelulósicos causando un aumento en la digestibilidad. A pesar de ello, la utilización extensiva de métodos físicos o químicos para la delignificación de desperdicios lignocelulósicos no se ha implementado a nivel práctico.

Por otro lado, la degradación biológica de la lignina es un proceso que sucede en la naturaleza bajo ciertas condiciones, ya que de otra forma se presentaría una acumulación continua de este material en el medio ambiente. La síntesis de tejidos vegetales como resultado de la fijación de carbono atmosférico, se encuentra en equilibrio con su degradación que resulta en la liberación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , completando así el ciclo del carbono. El proceso de biodegradación de los tejidos vegetales se debe a la acción de varias clases de microorganismos que muestran una especificidad sobre cada uno de los principales componentes de los tejidos vegetales, hemicelulosa, celulosa y lignina. La biodegradación de cada uno de estos biopolímeros ocurre con una

cinética específica. En general las hemicelulosas son el polímero que más rápida y fácilmente se degrada siguiéndole la celulosa, y por último la lignina como el más resistente a la biodegradación.

A pesar de la importancia que reviste la biodegradación de la lignina con el reciclaje del carbono orgánico y la utilización de desperdicios vegetales, su estudio ha sido relativamente descuidado hasta fechas recientes (Kirk, Connors, Zeikus, 1977; Ander y Eriksson, 1978). Posibles causas de ello son la complicada naturaleza química de la lignina, el número reducido de microorganismos que son capaces de atacar a la lignina y la lentitud con que se lleva a cabo su biodegradación.

En los últimos años se ha obtenido algo de información sobre el tipo de organismos capaces de degradar la lignina y varios de los factores que controlan este proceso en la naturaleza. Se ha encontrado que únicamente ciertos hongos pueden atacar a la lignina. Estos hongos se encuentran clasificados dentro de dos categorías: hongos de la pudrición blanca y hongos de la pudrición oscura. Esta denominación se basa en los cambios físicos causados en la madera por la acción de estos hongos. Los hongos de la pudrición oscura causan únicamente cambios menores en la estructura de la lignina, mientras que los de la pudrición blanca son capaces de degradarla completamente (Kirk, Connors y Zeikus, 1977).

El mecanismo preciso con que este biopolímero es degradado no se conoce con exactitud. Se ha postulado un esquema general sobre el mecanismo de degradación de la lignina en base a

estudios en donde se incubó el micelio de hongos de pudrición blanca u oscura con compuestos aromáticos de bajo peso molecular (de estructuras similares a la lignina) o bien con ligninas de varios tipos de vegetales, analizando los cambios (químicos y estructurales) en los sustratos usados (Kirk, Connors y Zeikus, 1977; Ander y Eriksson, 1978). Se ha visto que ambos tipos de hongos causan una disminución en el contenido de grupos metoxilo de la molécula de la lignina (Ander y Eriksson, 1978), aunque únicamente los hongos de la pudrición blanca han demostrado poder romper los enlaces éter similares a los de la lignina (del tipo arilglicerol - $\beta$ -aril) (Kirk, 1971).

Por otro lado, sólo los hongos de la pudrición blanca producen fenoloxidasas extracelulares. Usando compuestos aromáticos modelo, se ha comprobado que estas enzimas hidroxilan los anillos aromáticos y pueden causar una ruptura oxidativa de los anillos aromáticos (Kirk y Chang, 1974, 1975); así como, otras relaciones de probable relevancia en la degradación de la lignina. Tal es el caso de la formación de radicales libres, los que pueden incluir la ruptura de los enlaces entre el anillo aromático y la cadena lateral de fenil propano (Kirk, Harkin y Couling, 1968). A pesar de tal información, se desconoce la importancia de todas estas reacciones en la degradación de lignina *in situ*, ya que al incubarse estas enzimas con lignina purificada de tejidos vegetales se produce únicamente una disminución en el contenido de metoxilos y una polimerización (Ander y Eriksson, 1978).

Por medio del estudio de mutantes de un hongo de pudrición blanca, que eran incapaces de producir fenoloxidasas (Ander y Eriksson, 1976a, 1976b), se ha demostrado recientemente que la degradación de la lignina in vivo requiere indispensablemente de la presencia de fenoloxidasas. También fue posible identificar otra función de las fenoloxidasas en la degradación de las lignocelulosas, la de regular la producción, tanto de las enzimas degradadoras de la lignina como de los polisacáridos. De manera similar, el grupo de Ander y Eriksson (1978) ha producido mutantes acelulolíticas del hongo *S. pulverulentum* y ha demostrado la existencia de una enzima, la celobiosa quinona oxidoreductasa, que funciona como enlace en las rutas del metabolismo de los polisacáridos y la lignina.

A pesar de estos esfuerzos, hasta la fecha no se han logrado producir cepas o encontrar las condiciones en las cuales es posible inducir una eficiente delignificación selectiva (Yang et al, 1980; Crawford, 1981; Eriksson, 1981; Streater et al, 1981; Eriksson y Vallander, 1982). En el caso de las cepas acelulolíticas de *S. pulverulentum*, el problema ha consistido en la dificultad que presenta el mejoramiento genético de los hongos en general, y el muy difícil manejo genético de *S. pulverulentum* en particular. Por ello, estos investigadores se han limitado a la producción de varias mutantes acelulolíticas y la evaluación de sus correspondientes capacidades para atacar a la lignocelulosa. Dado lo inespecífico de los agentes mutagénicos, es previsible que las mutantes acelulolíticas obtenidas, adolezcan de otro tipo de alteraciones en su genoma que ocasionen

una pérdida generalizada de vigor. Esto a su vez resulta en cepas incapaces de ser utilizadas directamente (sin mejoramiento genético) para un proceso industrial de biodegradación (Crawford, 1981; Eriksson, 1981).

Se ha presentado previamente una descripción de los diferentes esfuerzos realizados en los últimos 20 años en diferentes partes del mundo para el desarrollo de tecnologías que permitan la utilización del recurso tan valioso representado por los polisacáridos contenidos en los desperdicios lignocelulósicos. Se analizaron las causas del fracaso de tales esfuerzos, concluyéndose que esto se debió a que la presencia de la lignina en los tejidos vegetales no fue considerada. O mejor dicho, no se consideró que al estar íntimamente asociada con los polisacáridos vegetales, obstaculiza su degradación ya sea por métodos químicos, enzimáticos o microbiológicos. Consecuentemente, la llave que permitiría tener acceso a estos recursos es el desarrollo de un proceso que permita una degradación selectiva de la lignina. Este proceso podría ser de tipo microbiológico debido a la demostrada ineficiencia y elevados costos de los procesos químicos.

La biodegradación de la lignina ha sido en general poco estudiada. La mayoría de las investigaciones en esta área están caracterizadas por un enfoque fuertemente bioquímico; se han estudiado principalmente los cambios producidos por diferentes tipos de hongos (o sus extractos) sobre compuestos aromáticos modelo y varios tipos de ligninas purificadas.

Hasta la fecha no se ha hecho ningún esfuerzo para obtener información sobre el mecanismo genético que controla la producción del sistema enzimático para la degradación de la lignina, existiendo una sola investigación en esta área en la que se hace uso de técnicas genéticas. Precisamente la elucidación de este mecanismo es de gran importancia tanto por los aspectos científicos básicos, como los de la aplicación práctica de estos conocimientos. El desarrollo de una tecnología a nivel comercial que permita la utilización de los recursos lignocelulósicos resulta inconcebible sin que se haya obtenido tal información, ya que únicamente a través de una degradación microbiológica de la lignina se tienen buenas perspectivas de lograr este objetivo.

Por las razones anteriores, se decidió estudiar los mecanismos genéticos de control de los sistemas enzimáticos para la degradación de lignocelulosa utilizando a los basidiomicetos como modelo experimental. Esta información, además de aumentar el conocimiento sobre un aspecto tan descuidado como es la genética de hongos superiores, es indispensable para la selección de organismos capaces de degradar selectivamente lignina.

La falta de estudios sobre la genética de la degradación de la lignina se debe a que la gran mayoría de los hongos de la pudrición blanca son basidiomicetos y el estudio de la genética de los basidiomicetos ha sido una disciplina relativamente descuidada, en parte como consecuencia de las dificultades inherentes a su manejo. Numerosos basidiomicetos presentan requerimientos nutricionales complicados, lo que hace que su cultivo en el laboratorio sea muy problemático. La mayoría de los

basidiomicetos son de crecimiento muy lento, por lo que no es posible obtener generaciones en plazos cortos, como sucede con las bacterias. Por ello los cultivos de basidiomicetos son muy susceptibles a ser contaminados con mohos que pueden crecer rápidamente en los medios usados. Un factor que introduce un mayor grado de dificultad en el manejo de los basidiomicetos, es la complejidad en el control genético de sus reacciones sexuales. Asimismo, el ciclo de vida de la mayoría de los basidiomicetos no puede ser completado en el laboratorio, ya que muchas veces se requieren condiciones ambientales muy específicas para inducir los estadios finales de su desarrollo sexual.

Dentro de los diferentes tipos de hongos de la pudrición blanca, se seleccionó al hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, como organismo modelo para la realización del presente proyecto, debido precisamente a sus características genéticas y fisiológicas que permiten que las dificultades antes enumeradas disminuyan a un mínimo. *Pleurotus ostreatus* es el hongo de la pudrición blanca que ha sido genéticamente más estudiado (Eger, Eden y Wissing, 1976; Eger, 1978a, 1978b; Eger y Leal-Lara, 1978; Leal-Lara, 1978 y Eger, 1978; Eger, Li y Leal-Lara, 1979; Eger y Leal-Lara, 1979; Leal-Lara y Eger, 1980; Li, 1980). Estos estudios indican que la manipulación genética de este organismo es posible y no tan complicada (Leal-Lara y Eger-Hummel, 1982). Además se cuentan con puntos de referencia en el cromosoma de *Pleurotus ostreatus*, unos corresponden a los genes que participan en el proceso de fructificación y esporulación sexual (Leal-Lara, 1980) y otros a los genes que determinan la tolerancia a

temperaturas elevadas (Li, 1980). Estos estudios han sido a su vez posibles debido a la existencia de suficiente información sobre la fisiología de *Pleurotus ostreatus* que permitió desarrollar métodos para poder inducirlo rutinariamente a completar su ciclo de vida en el laboratorio (Eger, Eden y Wissing, 1976; Eger, 1978b).

Otro aspecto tomado en consideración en la selección de *Pleurotus ostreatus*, es su capacidad para degradar lignina selectivamente. Desde hace tiempo se sabe que entre los hongos de pudrición blanca existen diferencias respecto a su habilidad para atacar selectivamente a la lignina o los polisacáridos vegetales (Kirk y Moore, 1972; Kirk y Harkin, 1972). Recientemente, Ander y Eriksson (1977) desarrollaron pruebas que permiten identificar a los hongos de la pudrición blanca que degradan selectivamente lignina, reportándose que *Pleurotus ostreatus* se encuentra dentro de ellos.

*Pleurotus ostreatus* es un hongo saprobita de la madera que en la naturaleza se encuentra fructificando en los troncos de árboles muertos (Guzmán, 1977). Es un hongo comestible sumamente apreciado, que ha sido cultivado en Europa Central y Asia desde tiempos antiguos. En la actualidad se le cultiva principalmente en Japón e Italia utilizando desperdicios vegetales lignocelulósicos como sustrato (Lelley y Schmaus, 1976; Chang y Hayes, 1978; Delmas, 1979).

El ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus* implica una serie de etapas que van desde la germinación de las esporas hasta la

formación de los cuerpos fructíferos. La estructura visible conocida vulgarmente como setas, hongos o científicamente, como cuerpo fructífero o esporoforo es la última etapa de su ciclo de vida y corresponde a la fase reproductiva. Fuera del alcance visual directo permanece casi la totalidad del tiempo en fase vegetativa. El micelio es funcionalmente similar al sistema reticular (raíces) de los vegetales, además tiene como función la sujeción del esporoforo al suelo o sustrato. Al madurar los esporoforos se producen las esporas sexuales en las lamelas del sombrero y son expulsadas al medio ambiente cuando se abre totalmente el esporoforo. En condiciones adecuadas las esporas germinan y dan lugar al micelio monocariótico. El apareamiento entre monocariotes compatibles da origen al micelio dicariótico. Este al ser sometido a condiciones ambientales adecuadas forma los esporoforos que nuevamente producen esporas para que el ciclo vuelva a comenzar. Las principales estructuras de las diferentes etapas de su ciclo de vida se ilustran en la Figura 1.2.

Dados los antecedentes del cultivo comercial de este hongo en desperdicios vegetales, varios investigadores se han interesado en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* en el laboratorio usando como sustrato varios tipos de materiales lignocelulósicos: aserrín de varias clases de maderas (Block, Tsao y Han, 1958; Omori, 1974; Kenashiro, 1977), pajas de casi todo tipo de cereales como arroz, avena, cebada, centeno, mijo, maíz (olotes también) y trigo (Bano y Srivastana, 1962; Jablonsky, 1975; Zadrazil, 1975, 1976, 1977; Zadrazil y Brunnet, 1979) y desperdicios de la industria papelera (Omori, Sato e Yoshida,

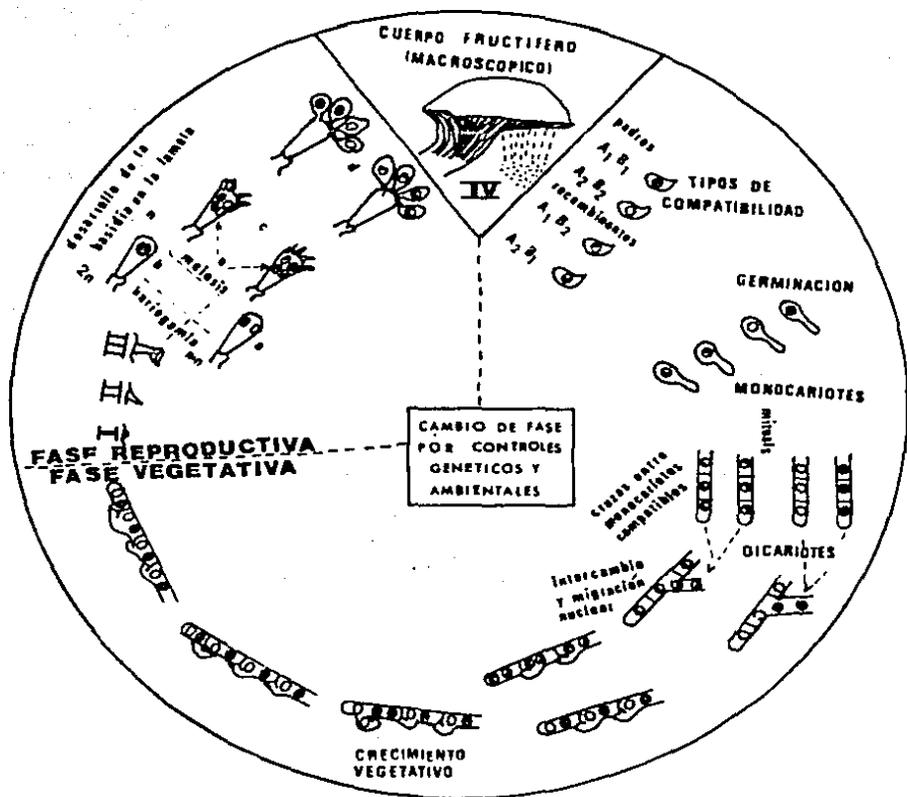


FIGURA 1.2 CICLO DE VIDA DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus*

1977; Omori, Kanno e Yoshida, 1977) entre otros. En la mayor parte de estas investigaciones se han estudiado exclusivamente las cantidades de esporoforos (=cuerpos fructíferos) que se obtienen en los diferentes sustratos; mientras que los cambios de composición del sustrato no han sido investigados, a excepción de los trabajos de Zadrazil.

Una desventaja en común a todas las investigaciones es que en casi ninguna de ellas se ha usado más de una cepa de *Pleurotus ostreatus* para comparar resultados. Esto es de suma importancia ya que la variabilidad genética de este organismo es enorme, como fue demostrado en estudios sobre el control genético de los procesos de fructificación y esporulación sexual de *Pleurotus ostreatus* (Leal-Lara; Li, 1980). Por lo tanto, es de esperarse que al usar varias cepas se presenten diferencias considerables en la cinética con que cada componente del sustrato es degradado, así como, en los rendimientos de esporoforos.

En un trabajo previo se estudió el consumo de glucanos con respecto al de lignina de 5 diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus*. Como resultado de este estudio se corroboró que *Pleurotus ostreatus* posee la capacidad natural para consumir lignina, con la desventaja de consumir de manera simultánea a los polisacáridos celulosa y hemicelulosa. Además, los resultados de este trabajo permitieron seleccionar a la cepa: H1(8x 3) x So.18, la cual presentó un menor consumo de carbohidratos por cantidad de lignina degradada con respecto a las otras cepas (Aguilera V. et al, 1982).

El objetivo de este trabajo consistió en obtener cepas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. Así las cepas obtenidas podrán ser utilizadas posteriormente para transformar los desperdicios agrícolas o forestales resistentes a la degradación biológica, en alimentos capaces de ser utilizados por los rumiantes. Para ello se planteó en primer término, producir mutantes acelulolíticas debido a que este hongo posee la capacidad natural de consumir lignina, pero con la desventaja de consumir de manera simultánea a la celulosa. Una vez obtenidas las mutantes, se llevó a cabo un mejoramiento genético para determinar el número de genes involucrados en el carácter acelulolítico, así como, obtener cepas más vigorosas que las mutantes.

## II MATERIALES Y METODOS

### 2.1. CEPAS FUNGICAS.

#### 2.1.1 Cepas de *Pleurotus ostreatus* utilizadas para producir mutantes acelulolíticas.

La producción de mutantes acelulolíticas se realizó con la cepa dicariótica de *Pleurotus ostreatus* H1(8 x 3) x So. 18 (denominada en este trabajo como 8 x 3). Esta cepa corresponde a un híbrido obtenido por el Dr. Leal, el cual tiene las características de crecimiento vigoroso y facilidad para producir esporoforos. Su selección se fundamentó en los resultados obtenidos en un trabajo previo (Aguilera V. et al., 1982) en donde se comparó el consumo de celulosa con respecto al de lignina de 5 cepas de *Pleurotus ostreatus*. Los resultados obtenidos indicaron que la cepa H1(8 x 3) x So. 18 consumió menor cantidad de carbohidratos por gramo de lignina degradada.

La producción de mutantes a partir de micelio monocariótico fragmentado se llevó a cabo utilizando los componentes monocarióticos de la cepa H1(8 x 3) x So. 18 denominados nh-1 y nh-4. Para producir mutantes a partir de basidiosporas se utilizaron las esporas provenientes de un cuerpo fructífero de la cepa dicariótica H1(8 x 3) x So. 18.

### 2.1.2 Cepas monocarióticas de *Pleurotus ostreatus* utilizadas para el mejoramiento genético.

La selección del monocariote silvestre más adecuado y compatible con la mutante acelulolítica se realizó a partir de 16 cepas monocarióticas de *Pleurotus ostreatus* donadas por la Dra. Eger. En la Tabla 2.1 se presentan sus principales características y sus claves correspondientes.

## 2.2 MEDIOS UTILIZADOS PARA EL DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE LAS CEPAS.

### 2.2.1 Medio de agar extracto de malta.

Para preparar 500 ml de medio de extracto de malta agar, se pesan 7.5 g de extracto de malta y 10 g de agar y se colocan en un matraz erlenmeyer de un litro. Se adicionan 500 ml de agua destilada gradualmente, procurando disolver los reactivos. A continuación se tapa el matraz y se deja reposar durante 20 minutos. Posteriormente, se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. El medio estéril se vacía en cajas petri de plástico de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio se guardan las cajas petri en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

**TABLA 2.1 PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS MONOCARIOTICAS DE *Pleurotus ostreatus* UTILIZADAS EN LA SELECCION DEL MONOCARIOTE COMPATIBLE CON LA MUTANTE 56 H1-N1.**

CARACTERISTICAS	CEPAS
Monocariotes fructificantes con vigoroso crecimiento miceliar.	Mo. 24
	Mo. 36
	Mo. 37
	Mo. 127
	P2-IE
	P3-IR
	P4-nh1
	3004-H26
	42-H1/Mo. 12
	42-H1/Mo. 41
Monocariotes fructificantes con reducida producción de esporas.	Mo. 3
	Mo. 6
	nh1/H1-Gy.
	nh2/H1-Gy.
Componentes monocarioticos de la cepa asporogena 42 x 11.	nh-11
	nh-42

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

Se prepara primeramente una solución concentrada de extracto de malta deproteinado. Para esto se pesan 20 g de extracto de malta y se disuelven en 250 ml de agua destilada. Se mide el pH de la solución anterior y se eleva 1.5 unidades con una solución de NaOH 1N. Después se adicionan 1.4 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , se mezcla y esteriliza en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos. Una vez frío se filtra para obtener la solución concentrada. Posteriormente se toman 75 ml del filtrado y se mezclan con 425 ml de agua destilada y 10 g de agar. Se deja reposar durante 20 minutos y se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 lbs de presión durante 15 minutos. El medio estéril se vacía en cajas petri desechables de 9 cm de diámetro y se guardan en bolsas de polietileno.

La preparación de los medios de DPMA al 0.3 y 0.5% se realiza pesando 3 y 5 g de extracto de malta por cada litro de medio a preparar y procede de igual forma que para el medio de DPMA.

### 2.2.3 Medio de agar agua.

Para preparar 500 ml de medio se pesan 10 g de agar en un matraz erlenmeyer de 1 litro y se adicionan 500 ml de agua destilada. Se tapa el matraz y se deja reposar durante 20 minutos. Posteriormente, se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. El medio estéril se vacía en cajas

petri de plástico de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio se guardan las cajas petri en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

#### 2.2.4 Medio de sales minerales (primera capa).

Para preparar un litro de la solución de sales minerales se disuelven en 500 ml de agua destilada las siguientes sales en el orden indicado:

SALES -----	CANTIDAD -----
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	4.0 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.2 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.8 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg
Citrato ferrico amoniacal	5.0 mg
$\text{CaCl}_2$	20.0 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.89 mg

Las últimas dos sales se deben de disolver por separado e integrar al volumen total de un litro.

Para preparar el medio se ajusta el pH de la solución de sales a 4.5 y se adicionan 20 g de agar por cada litro de medio, se deja reposar durante 20 minutos y esteriliza en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. A continuación se vierten 15 ml del medio en cada caja petri desechable y se guardan en bolsas de polietileno.

### 2.2.5 Medio de carboximetil celulosa (segunda capa de CMC).

Para la preparación de este medio se requiere someter a la CMC a un tratamiento ácido (Walseth) para permitir su hidratación.

Para el tratamiento Walseth se dejan enfriar 4 g de carboximetil celulosa (CMC) y 51 ml de ácido fosfórico durante 30 minutos. Posteriormente se vacía un poco de ácido fosfórico en un vaso de precipitados de 100 ml previamente enfriado y se adiciona un poco de CMC, tratando de incorporarla al ácido con la ayuda de un agitador. Esta operación se continúa hasta que toda la CMC se incorporara en forma homogénea con el ácido. La mezcla homogénea se deja enfriar durante dos horas. A continuación se licua con 500 ml de agua destilada y se filtra con vacío para eliminar el exceso de ácido. El precipitado obtenido se lava de igual forma dos veces más y se deja en 500 ml de una solución de carbonato de sodio al 1% durante 8 horas para neutralizar el exceso de acidez. Al día siguiente se lava nuevamente 3 veces más con agua destilada. A continuación se determina la humedad del precipitado obtenido y éste se suspende en 250 ml de la solución de sales. Después de conocer la humedad se adiciona la cantidad necesaria de solución de sales para obtener una suspensión de CMC al 1%.

Para preparar el medio de CMC se ajusta el pH de la suspensión de celulosa Walseth a 4.5 y se le adiciona 0.05% de glucosa y 2% de agar. Se deja reposar durante 20 minutos y se calienta hasta ebullición. Posteriormente, se vacían 10 ml del medio en tubos de ensaye y se tapan para ser esterilizados en

autoclave a 121°C durante 15 minutos. A cada tubo con medio estéril se le adiciona en condiciones asepticas 50 µl de una solución de deoxicolato de sodio al 0.04% y 10 µl de solución de tiamina al 0.01 mg%. Finalmente se agitan los tubos para homogeneizar el medio y se vacia cada tubo sobre las cajas petri que contienen el medio de sales minerales o los medio de DPMA al 0.3 o al 0.5%.

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

#### 2.2.6 Medio de agar papel filtro.

El papel filtro utilizado fue de la marca Selecta # 595 (Carl Schleicher and Shull, marca registrada en la República Federal de Alemania), debido a que de acuerdo a las especificaciones del proveedor contiene más del 99% de alfa celulosa.

El papel filtro se corta en cuadros de 0.5 cm de lado aproximadamente y se introducen en un matraz erlenmeyer de 25 ml con 10 ml de agua destilada. Se esterilizan a 121°C durante una hora y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente los cuadros de papel filtro estéril se colocan asepticamente en las cajas petri que contienen medio de peptona (0.05 y 0.1%) o en el medio de agar agua. Para colocar el papel se divide la caja petri en dos secciones iguales por medio de una línea vertical

que pase por el centro de la caja. Únicamente en la sección del lado derecho se colocan de manera equidistante 3 cuadros de papel filtro estéril sobre una línea vertical imaginaria situada al centro de la sección. Una vez colocado el papel se incuban las cajas petri invertidas en una estufa a 28°C durante 24 horas, para que el exceso de agua del papel sea absorbido por el medio. Al día siguiente cada caja es inoculada con 6 cilindros de agar con micelio de 0.5 cm de diámetro, cortados de la periferia de una colonia en crecimiento. Tres de los cilindros se reparten, colocandolos sobre cada cuadro de papel filtro y los otros tres cilindros se reparten sobre la sección del lado izquierdo de manera paralela a los cuadros de papel filtro.

Se consideraron como cepas acelulolíticas aquellas que presentaron igual crecimiento sobre ambas secciones de la caja petri.

#### 2.2.7 Medio de peptona al 0.05 y 0.1%.

Para preparar 500 ml de medio se pesan 0.25 o 0.5 g de peptona de carne y 10 g de agar (en ambos casos) y se colocan en un matraz erlenmeyer de un litro. Se adicionan 500 ml de agua destilada y se deja reposar durante 20 minutos. Posteriormente se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos, del medio estéril se vacían 15 ml en cada caja petri. Una vez solidificado el medio, se guarda en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar contaminaciones y deshidratación del medio.

### 2.2.8 Medio de agar paja.

Para preparar éste medio se muele la paja de trigo en una licuadora durante 5 minutos. A continuación se pesa 1 gramo de paja y se deja hidratar con 10 ml de agua destilada durante una hora. Posteriormente se le adicionan 10 ml de medio de peptona al 0.2% con 4% de agar y se esteriliza a 121°C durante 30 minutos. Al mismo tiempo se preparan 20 ml de medio de peptona al 0.1% y se esterilizan de igual forma. Cada uno de los medio se vacian en una caja petri desechable y se dejan enfriar hasta que solidifiquen. Una vez frios, de cada uno de estos medios se cortan cilindros de 1 cm de diámetro con la ayuda de un horador estéril para ser colocados en cajas petri que contienen medio de peptona al 0.1%. Para ello se divide la caja petri en dos secciones iguales por medio de una línea vertical imaginaria que pase por el centro de la caja. En la sección del lado derecho se colocan de manera equidistante 3 cilindros del medio de paja sobre una línea vertical imaginaria situada al centro de la sección. En la sección del lado izquierdo se colocan de igual forma 3 cilindros del medio de peptona al 0.1%. Estas cajas se inoculan con 6 cilindros de agar con micelio de 0.5 cm de diámetro, cortados de la periferia de una colonia en crecimiento. Tres de los cilindros se reparten, colocandolos sobre cada uno de los cilindros de paja y los tres cilindros restantes se colocan sobre los cilindros de peptona.

## 2.3 CONDICIONES PARA PRODUCIR MUTANTES ACELULOLITICAS (C-).

### 2.3.1 Fragmentación del micelio monocariótico.

Para obtener el micelio monocariótico fragmentado primero se inoculan 2 cajas petri con medio de DPMA con cuatro inóculos cada caja de las cepas nh-1 o nh-4. Las cajas inoculadas se incuban a 28°C durante 5 días. Posteriormente, se homogeneizan las 8 colonias obtenidas con 100 ml de agua destilada durante 1 minuto. Por separado se preparan dos matraces erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio de DPMA líquido. Cada matraz se inocula en condiciones asépticas con 10 ml del homogenado y se incuban a 28°C durante 5 días. El contenido de cada matraz se vierte en un frasco de centrifuga estéril de 250 ml de capacidad y se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se descarta y el micelio precipitado se lava 3 veces con 150 ml de agua destilada estéril, centrifugando en cada lavado. El micelio precipitado después del último lavado se homogeneiza con 100 ml de solución isotónica al 1% durante 3 minutos. Por conteo al microscopio se determinó que la suspensión miceliar contiene  $10^7$  fragmentos/ml aproximadamente.

### 2.3.2 Obtención de basidiosporas.

Para obtener basidiosporas se inoculan en el centro 5 cajas petri con medio de agar extracto de malta con la cepa dicariótica 8 x 3. Las cajas inoculadas se incuban a 28°C hasta que el medio

es invadido por completo con el desarrollo miceliar de la cepa. En este momento las cajas se sacan de la estufa de incubación y se colocan en una mesa para ser expuestas a la acción de la luz natural. Se dejan bajo estas condiciones hasta la aparición de los primordios. Una vez que aparecen los primordios se le retira la tapa a la caja petri y ésta se coloca dentro de una bolsa de polietileno (15 cm de ancho por 25 cm de largo). Para permitir el intercambio gaseoso se le hacen 4 horadaciones a la bolsa situadas un centímetro arriba del borde de la caja petri. La humedad relativa dentro de la bolsa se eleva colocando tiras de papel absorbente a lo largo de la bolsa y adicionando agua en el fondo de la bolsa. Las cajas así preparadas se exponen a la luz natural y a la temperatura ambiente, para permitir el desarrollo de los cuerpos fructíferos. Bajo estas condiciones el desarrollo de los primordios hasta cuerpos fructíferos maduros tarda de 3 a 5 días.

Las esporas de los cuerpos fructíferos maduros se colectan sobre un papel filtro estéril colocado dentro de una caja petri estéril. Para ello la base del pie del esporoforo se coloca sobre un cuadro de vidrio para evitar que el papel se humedezca. La caja con el hongo se introduce en una cámara húmeda semejante a la usada para la fructificación y se deja bajo las mismas condiciones de 12 a 24 horas. Posteriormente se remueve el papel filtro con las esporas y se guarda dentro de un sobre estéril que se introduce en una bolsa de polietileno con unos granos de sílica gel. Las esporas se almacenan en refrigeración a 4°C.

### 2.3.3 Metodología de mutación.

El agente mutagénico utilizado para la obtención de mutantes acelulolíticas fue N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina (MNNG o nitroso guanidina). El mutágeno se prepara disolviendo 5 mg de MNNG en 25 ml de amortiguador de citratos 0.01M a pH 5.

El proceso de mutación se realiza mezclando una parte de la solución del mutágeno con una parte de la suspensión de micelio monocariótico fragmentado o de la suspensión de basidiosporas y se deja reaccionar durante 60 minutos a temperatura ambiente. La acción del mutágeno se detiene adicionando cuatro partes de agua destilada estéril. Bajo estas condiciones se obtiene una suspensión de micelio fragmentado o basidiosporas con un porcentaje de letalidad del 99.99.

### 2.3.4 Metodología para la recuperación de mutantes acelulolíticas.

Una vez que se obtiene el material biológico mutado, la recuperación de mutantes acelulolíticas se lleva a cabo en un medio de dos capas. El medio que resultó ser el más selectivo para la recuperación está compuesto por una primera capa de 15 ml de medio de DPMA al 0.5% y una segunda capa de 10 ml de medio de CMC al 1%. Sobre el medio primera capa se inocula 1 ml del material mutado y se esparce sobre toda la superficie de la placa con la ayuda de un bastón de vidrio estéril. A continuación se vierte la segunda capa de CMC. Para la recuperación de mutantes a

partir de esporas fue necesario dejar incubar las esporas mutadas en la primera capa del medio durante 5 días, para permitir su germinación y a continuación se adicionó la segunda capa del medio.

Las cajas que contienen el material mutado se dejan incubar a 28°C durante 14 días. Finalmente se examinan las cajas y se aislan como posibles mutantes a todas aquellas colonias que no forman un halo en el medio de celulosa. Las posibles mutantes se siembran en medio de agar extracto de malta para obtener su crecimiento micelial y poder realizar su caracterización.

## 2.4 MEJORAMIENTO GENETICO.

### 2.4.1 Hibridización de cepas monocarióticas.

Para hibridizar monocariotes se corta un cuadro de agar de 0.5 x 0.5 cm de lado de la periferia de una colonia en crecimiento, de cada uno de los dos monocariotes a hibridizar. Estos cuadros de agar se colocan en una caja petri con medio de extracto de malta lo más cercano posible. Por lo general se realizan en una misma caja petri entre 5 y 6 cruza. A continuación se incuban las cajas petri a 28°C por 6 días para ser observadas microscópicamente con el ocular de 16 campos de amplificación. Una cruza se determina como positiva cuando al observarla al microscopio se aprecian las conexiones "clausa". Para evitar errores se considera que la cruza es positiva cuando estas estructuras son observadas por lo menos en tres diferentes

puntos situados de manera equidistante en la periferia de la colonia. Las conexiones clamp son estructuras que se forman únicamente cuando se lleva a cabo una fusión celular entre las cepas hibridizadas. Es por ello que su presencia implica que los dos monocariotes apareados son compatibles y por lo tanto dan origen a la formación de un dicariote.

#### 2.4.2 Germinación de esporas y aislamiento de monocariotes.

Para la germinación de esporas se corta un pequeño pedazo del papel filtro que contiene a las esporas y se deposita en un tubo de ensayo con 1 ml de agua destilada estéril y se agita. La suspensión de esporas resultante se diluye hasta obtener por conteo al microscopio 30 esporas por cada 20  $\mu$ l de suspensión. Diez cajas petri con medio de extracto de malta se inoculan cada una con 20  $\mu$ l de la suspensión de esporas y se incuban a 28°C durante 2 días. A partir de este momento se examinan todos los días y durante 10 días todas las cajas con la ayuda de un estereomicroscopio y se transfieren todas las esporas que germinen a cajas petri con medio de extracto de malta.

### 2.5. EVALUACION DE LOS PATRONES DE CONSUMO DE LOS DICARIOTES ACELULOLITICOS SOBRE PAJA DE TRIGO.

#### 2.5.1 Producción del inóculo de grano.

Se le conoce como inóculo de grano al crecimiento micelial obtenido en el grano de algún cereal como trigo, centeno o mijo.

El inóculo de grano se utiliza para sembrar la cepa deseada en un sustrato determinado y así evaluar la forma en que éste es consumido por la cepa probada.

Para preparar el inóculo de grano se lava el grano de trigo y se cuece en agua a temperatura de ebullición durante 50 minutos. A continuación se drena el agua caliente y se enfría el grano al chorro de agua. El grano frío se pesa y se le adicionan  $\text{CaSO}_4$  al 1.3% y  $\text{CaCO}_3$  al 0.3%, se mezcla y se coloca en frascos de vidrio, que se llenan hasta la mitad de su capacidad. Los frascos de vidrio se tapan con hule espuma y papel aluminio. Posteriormente se esterilizan los frascos a  $121^\circ\text{C}$  y 15 libras de presión durante una hora. Una vez frío el grano se inocula cada frasco con el micelio proveniente de una caja petri sembrada una semana antes. Los frascos inoculados se incuban a  $28^\circ\text{C}$  durante 8 días.

#### 2.5.2 Acondicionamiento e inoculación de la paja de trigo.

Para el acondicionamiento la paja se corta en pedazos de 5 a 10 cm de largo, se hidrata durante 90 minutos (sumerjiendola en agua a temperatura ambiente) y se pasteuriza a  $85 \pm 5^\circ\text{C}$  durante 45 minutos (por inmersión en agua a temperatura de ebullición). A continuación se deja drenar el exceso de agua durante 30 minutos y se esparce sobre una mesa aseptica para bajar la temperatura hasta  $25^\circ\text{C}$ . Para cada cepa se inoculan 8 Kg de la paja pasteurizada con 160 g de inóculo, empacandose el sustrato inoculado en 8 bolsas de plástico. Después de 25 y 50 días de

incubación a 28°C, se toman 2 bolsas de cada cepa y se secan para determinar posteriormente la composición del sustrato en términos de cenizas, lignina, celulosa y hemicelulosa. Se prepararon 4 bolsas adicionales por cada cepa para asegurar la toma de muestras en cada tiempo, considerando la posibilidad de contaminaciones.

### 2.5.3 Determinaciones analíticas.

#### 2.5.3.1 Determinación de cenizas.

Para cuantificar las cenizas se coloca un crisol a peso constante en una mufla a 550°C. Una vez frío el crisol se pesa 1 g de la muestra y se carboniza con la ayuda de un mechero. A continuación se coloca nuevamente el crisol en la mufla hasta obtener cenizas de color blanco o gris. Finalmente se deja enfriar el crisol dentro de un desecador y se pesa nuevamente.

#### 2.5.3.2 Determinación de lignina (Método de Effland).

Esta determinación se basa en que al tratar un material lignocelulósico con un ácido fuerte se hidrolizan todos los carbohidratos y por lo tanto se solubilizan, dejando un residuo insoluble que por definición es la lignina. Esta puede ser cuantificada gravimétricamente (Effland y col., 1977).

Para determinar la lignina se pesa 1 g de muestra seca en un matraz erlenmeyer de 500 ml y se le adicionan 10 ml de ácido sulfúrico al 72%. Se mezcla la muestra para que se humedezca con

el ácido y se deja durante una hora. A continuación se adicionan 280 ml de agua destilada, se tapa el matraz con hule espuma y papel aluminio y se esteriliza a 121°C y 15 libras de presión durante una hora. Después del tratamiento térmico el contenido del matraz se filtra en caliente en papel Whatman No. 1 previamente tarado. El sobrenadante se elimina y el precipitado de lignina se lava con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado alcance un valor cercano a 6. Posteriormente se seca el papel filtro hasta peso constante a 60°C. El material residual representa la lignina aparente. Para determinar la lignina real se requiere cuantificar la cantidad de cenizas insolubles que permanecieron retenidas en la lignina aparente. Para ello se toman entre 0.2 y 0.4 g de lignina aparente y se le determinan las cenizas. La cantidad de lignina real se calcula de la siguiente manera:

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

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

### 2.5.3.3 Extracción de carbohidratos.

Para extraer los carbohidratos se pesan 200 mg de muestra en un tubo de centrifuga de 15 ml de capacidad y se le adicionan con agitación 10 ml de ácido sulfúrico al 67%. La muestra se deja reposar durante una hora a temperatura ambiente, agitando cada 15 minutos. A continuación se centrifuga a 5,000 rpm durante 20 minutos y se elimina el precipitado obtenido. En la solución resultante se determinan los glucanos y xilanos.

#### 2.5.3.4 Determinación de glucanos (Método de Klein-Weissman).

En el método de Klein-Weissman (1953), las hexosas son oxidadas por el ácido sulfúrico para dar origen al formaldehído, el cual en presencia de ácido cromotrópico produce una coloración violeta proporcional al contenido de hexosas. La eficiencia del método analítico seleccionado y de los factores que interfieren en el desarrollo del color fueron estudiados en un trabajo previo (Aguilar, Hernández y Ramírez, 1982). Considerando los resultados obtenidos en dicho estudio, las condiciones óptimas para la cuantificación de hexosas son las siguientes:

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

Con las condiciones óptimas se realizó una curva patrón de glucosa en agua. Esta siguió la Ley de Lambert-Beer hasta una concentración de 40 mg/ml que corresponde a una absorbancia de 1.20 (Tabla 2.2).

La cuantificación de hexosas se lleva a cabo colocando 1 ml de la solución problema en un tubo de ensaye y añadiendo a continuación 5 ml del reactivo de Klein-Weissman. Los tubos de ensaye se tapan y colocan en un baño de agua a temperatura de ebullición durante 50 minutos. A continuación se enfrían los tubos inmediatamente y se leen a 570 nm contra un blanco de agua.

**TABLA 2.2 CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE GLUCANOS POR EL METODO MODIFICADO DE KLEIN WEISSMAN.**

<b>CONCENTRACION DE GLUCOSA (mg/ml)</b>	<b>ABSORBANCIA (<math>\lambda = 570 \text{ nm}</math>)</b>
0.00	0.00
0.05	0.14
0.10	0.34
0.15	0.42
0.20	0.60
0.25	0.77
0.30	0.90
0.35	1.10
0.40	1.20

**Coefficiente de correlación = 0.998**  
**Pendiente = 3.05**  
**Intercepto = -0.0022**

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

#### 2.5.3.5 Determinación de xilanos (Método de Tracey).

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

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

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

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que en el rango de concentraciones de 5 a 50  $\mu\text{g/ml}$  se cumple la Ley de Lambert-Beer (Tabla 2.3).

TABLA 2.3 CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE XILANOS  
UTILIZANDO COMO REFERENCIA UNA SOLUCION DE XILOSA EN  
ACIDO SULFURICO AL 67% (METODO DE TRACEY).

---

CONCENTRACION DE XILOSA (ug/ml)	ABSORBANCIA ( $\lambda = 475$ nm)
5	0.045
10	0.100
20	0.240
25	0.295
30	0.390
40	0.540
50	0.680

---

Coefficiente de correlación = 0.9976

Pendiente = 0.0138

Intercepto = -0.026

---

Para llevar a cabo esta determinación se colocan 2 ml de la muestra en un tubo de ensayo y se adicionan 6 ml del reactivo de Tracey. Los tubos de ensayo se dejan en la obscuridad a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. A continuación se toman las lecturas de las muestras a 475 nm contra un blanco de ácido sulfúrico al 67%.

El reactivo de Tracey se prepara mezclando en un frasco de color ámbar 100 ml de ácido acético glacial, 5 ml de ácido oxálico al 5%, 24 ml de agua destilada y 16 ml de anilina incolora. El reactivo no debe usarse después de una semana de su preparación.

### III EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

#### 3.1 DEFINICION DE LAS CONDICIONES PARA PRODUCIR MUTANTES ACELULOLITICAS (C-).

*Pleurotus ostreatus* es un hongo de la pudrición blanca que posee la capacidad natural para degradar lignina, con la desventaja de consumir de manera simultánea los polisacáridos celulosa y hemicelulosa. Se planteó por ello en este trabajo la producción de mutantes acelulolíticos (C-), es decir bloqueadas en su capacidad para consumir celulosa, con el objeto de obtener cepas que permitan una degradación selectiva de la lignina.

En el caso de los Basidiomicetos como *P. ostreatus*, existen dos posibilidades para la producción de mutantes, ya sea a partir del micelio monocariótico o de las esporas sexuales (basidiosporas).

El uso de micelio monocariótico presenta varias ventajas. El material inicial es genéticamente uniforme, debido a que todos los núcleos del micelio son idénticos. Adicionalmente, el micelio monocariótico se puede obtener en un tiempo relativamente corto (14 días). No obstante, la utilización del micelio monocariótico requiere que éste sea fragmentado en segmentos que contengan un sólo núcleo. En caso contrario, los fragmentos con más de un núcleo requieren de un tratamiento mutagénico más drástico, por lo que las cepas recuperadas se encuentran generalmente alteradas de manera múltiple y presentan bajas posibilidades de ser mejoradas genéticamente. Además los fragmentos multinucleados

sobrevivientes presentan una mayor posibilidad de complementar sus alteraciones durante la recuperación. Por lo anterior, es necesario emplear condiciones de fragmentación en las cuales se asegure la obtención de una alta concentración de segmentos en su mayoría uninucleados.

La producción de mutantes a partir de basidiosporas presenta a su vez la ventaja que éste es un material uninucleado, lo que evita que una vez obtenida una mutante, ésta pueda ser enmascarada fácilmente por complementación. Sin embargo, existe el gran inconveniente de la elevada diversidad genética del material inicial, ya que por ser el resultado del proceso meiótico, cada espora es un individuo con características propias. Una desventaja adicional es que se requieren de 35 a 40 días para obtener basidiosporas.

### 3.1.1 CONDICIONES DE MUTACION PARA MICELIO MONOCARIOTICO.

De acuerdo a la información disponible se utilizaron los componentes monocarióticos de la cepa 8 x 3 para producir micelio monocariótico fragmentado (Aviles Esquivel, M.E.; comunicación personal). Este se sometió a la acción del mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina (MNNG), al 0.02% (Eger, G., 1970). De esta manera (Materiales y Métodos 2.3.1, 2.3.3 y 2.3.4), se obtuvo una curva de letalidad y se determinaron las condiciones para producir mutantes acelulolíticas (C-).

La curva de letalidad se realizó sometiendo una alícuota de

la suspensión de micelio fragmentado con una concentración de  $1.7 \times 10^8$  fragmentos/ml (cuantificados al microscopio), a la acción del mutágeno durante diferentes tiempos. La cuantificación de los sobrevivientes para cada tiempo de mutación, incluyendo el tiempo inicial, se realizó por medio de diluciones desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$ . Cada dilución se inoculó por cuadruplicado en el medio de recuperación de doble capa (primera capa de sales y segunda capa de carboximetil celulosa al 1% y glucosa al 0.05%).

En la Tabla 3.1 se presentan los sobrevivientes cuantificados para cada tiempo y dilución. En general se observa que al tiempo cero, el número de fragmentos viables con respecto al número de fragmentos cuantificados al microscopio es menor por cuatro ordenes de magnitud,  $5.6 \times 10^4$  y  $1.7 \times 10^4$  respectivamente. Esto implica que un elevado número de segmentos son ligados durante la fragmentación.

Adicionalmente es importante hacer notar que al considerar los sobrevivientes obtenidos para la primera dilución a los diferentes tiempos de mutación se aprecia una incongruencia. Para tiempos de mutación menores a 35 minutos se presenta un número incontable de sobrevivientes, en tanto que, a partir de 40 minutos no se obtiene sobreviviente alguno. Sin embargo, al considerar las siguientes diluciones ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ), sí se detectaron sobrevivientes para tiempos de mutación mayores de 35 minutos. Este hecho se puede explicar considerando que el número de fragmentos viables es tan elevado al inicio, que un tiempo de mutación menor de 35 minutos no es suficiente para causar una elevada tasa de mortandad. A tiempos mayores, la

TABLA 3.1: CUANTIFICACION DE SOBREVIVIENTES DE MICELIO MONOCARIOTICO A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION AL MUTAGENO MNG (0.02%).

TIEMPO DE MUTACION (min)	COLONIAS CUANTIFICADAS A DIFERENTES DILUCIONES					
	<sup>-1</sup> 10	<sup>-2</sup> 10	<sup>-3</sup> 10	<sup>-4</sup> 10	<sup>-5</sup> 10	<sup>-6</sup> 10
0	*	*	557.8 ± 8.6	50.3 ± 4.1	5.3 ± 0.5	0
10	*	*	116.8 ± 9.5	11.0 ± 1.6	1.0 ± 0.8	0
20	*	*	120.0 ± 1.6	15.0 ± 1.6	1.0 ± 0.0	0
30	*	*	42.5 ± 4.4	5.0 ± 0.8	0	0
35	*	250.0 ± 3.3	24.3 ± 2.5	2.5 ± 0.5	0	0
40	0	20.0 ± 0.8	1.8 ± 0.5	0	0	0
45	0	18.0 ± 0.8	1.8 ± 0.5	0	0	0
50	0	2.5 ± 0.6	0	0	0	0
60	0	0.5 ± 0.6	0	0	0	0

\* Número incontable de colonias.

acción del mutágeno continua aún después de agregar las cuatro partes de agua destilada y los fragmentos viables en la primera dilución son eliminados por la acción del mutágeno.

En la Tabla 3.2 se observa una relación inversa entre el tiempo de mutación y la cantidad de sobrevivientes. Esta disminuye en un orden de magnitud al pasar de 20 a 30, de 35 a 40, de 45 a 50 y de 50 a 60 minutos de mutación.

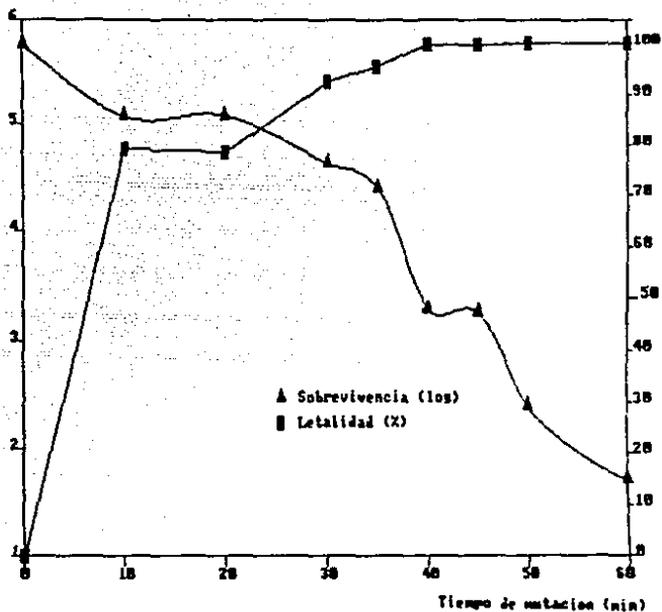
En la Tabla 3.2 y la Figura 3.1 se presentan los porcentajes de sobrevivencia y letalidad obtenidos para cada tiempo de mutación. Como se puede observar, a partir de los 40 minutos de mutación se obtiene más del 99% de letalidad. A los 60 minutos se alcanza un 99.99%, valor que de acuerdo a la bibliografía (Raper and Miles, 1958; Raper, Raper and Miller, 1972), se recomienda para asegurar la obtención de mutantes.

En conclusión, se puede decir que para producir mutantes acelulolíticas (C-) a partir de micelio monocariótico las condiciones más adecuadas consisten en:

- Utilizar una suspensión de micelio fragmentado con una concentración inicial de  $10^7$  a  $10^{11}$  fragmentos/ml (correspondiente a una concentración de  $10^8$  fragmentos viables/ml).
- Mezclar alicuotas iguales de micelio fragmentado con el mutágeno MNNG al 0.02% y dejar reaccionar durante 60 minutos.
- Parar la reacción con cuatro partes de agua destilada

TABLA 3.2: LETALIDAD DEL MICELIO MONOCARIOTICO A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION AL MUTAGENO MNNG (0.02%).

TIEMPO DE MUTACION (min)	SOBREVIVIENTES			LETALIDAD (%)
	NUMERO	LOGARITMO	%	
0	5.578 x 10 <sup>8</sup>	5.75	100.000	00.000
10	1.168 x 10 <sup>8</sup>	5.07	20.939	79.061
20	1.200 x 10 <sup>7</sup>	5.08	21.513	78.487
30	4.250 x 10 <sup>6</sup>	4.63	7.619	92.381
35	2.500 x 10 <sup>6</sup>	4.40	4.482	95.518
40	2.000 x 10 <sup>5</sup>	3.30	0.358	99.642
45	1.800 x 10 <sup>5</sup>	3.26	0.323	99.677
50	2.500 x 10 <sup>4</sup>	2.40	0.045	99.955
60	5.000 x 10 <sup>3</sup>	1.70	0.009	99.991



**Fig. 3.1** Curva de letalidad del micelio monocariótico al someterlo a la acción del mutágeno **MMSG**.

estéril y diluir hasta  $10^{-2}$ .

- Recuperar las mutantes en medio de doble capa que contiene celulosa al 1% y glucosa al 0.05% (Materiales y Métodos 3.4).

### 3.1.2 CONDICIONES DE MUTACION PARA BASIDIOSPORAS.

De manera similar a como se procedió con el micelio monocariótico, se obtuvo la curva de letalidad para determinar las condiciones de producción de mutantes acelulolíticas (C-) a partir de basidiosporas. Estas fueron obtenidas de la capa dicariótica 8 x 3 (Materiales y Métodos 3.2). La curva de letalidad se realizó sometiendo alicuotas iguales de la suspensión de esporas con una concentración de  $2 \times 10^6$  esporas/ml (contadas al microscopio), a la acción del mutágeno MNNG al 0.2% durante diferentes tiempos. La cuantificación de los sobrevivientes para cada tiempo de mutación, incluyendo el tiempo inicial, se realizó por medio de diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . Cada dilución se inoculó por cuadruplicado en la primera capa del medio de recuperación y 5 días después se adicionó la segunda capa del medio. Esta modificación en la forma de recuperar permitió la germinación de las esporas y su posterior propagación, ya que al tratar de recuperar las colonias de manera semejante a la realizada para el micelio monocariótico no se obtuvo sobreviviente alguno (Materiales y Métodos 3.4).

En la Tabla 3.3 se presentan los sobrevivientes cuantificados para cada tiempo y dilución. En general se observa que al tiempo

TABLA 3.3: CUANTIFICACION DE SOBREVIVIENTES DE BASIDIOSPORAS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION AL MUTAGENO MNNG (0.02%).

TIEMPO DE MUTACION (min)	COLONIAS CUANTIFICADAS A DIFERENTES DILUCIONES					
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
0	"	"	560 ± 8.0	55 ± 5.0	5 ± 0.0	0
10	"	"	120 ± 0.0	12 ± 0.0	1 ± 0.0	0
20	"	"	100 ± 2.0	12 ± 2.0	1 ± 0.0	0
30	"	"	40 ± 4.0	4 ± 1.0	0	0
35	"	290.0 ± 0.0	30 ± 0.6	0	0	0
40	"	22.0 ± 1.0	2 ± 0.0	0	0	0
45	201 ± 5.1	20.0 ± 0.6	2 ± 0.0	0	0	0
50	9 ± 1.0	1.0 ± 0.0	0	0	0	0
60	6 ± 0.6	0.7 ± 0.5	0	0	0	0

" = Numero incontable de colonias.

cero, el número de esporas viables con respecto al número de esporas cuantificadas al microscopio es nuevamente menor, por 3 ordenes de magnitud,  $2 \times 10^8$  y  $5.6 \times 10^8$  respectivamente.

En la Tabla 3.4 se observa una relación inversa entre el tiempo de mutación y el número de sobrevivientes. Este disminuye en un orden de magnitud al pasar de 20 a 30, 35 a 40 y 45 a 50 minutos de mutación. En la misma Tabla y Figura 3.2 se presentan los porcentajes de sobrevivencia y letalidad obtenidos para cada tiempo de mutación. Como se observa, a partir de los 40 minutos de mutación se obtiene más del 99% de letalidad y a los 60 minutos se alcanza un 99.989%.

En conclusión se puede decir que para producir mutantes acalulolíticas (C-), a partir de basidiosporas las condiciones más adecuadas consisten en:

- Utilizar una suspensión de esporas con una concentración inicial de  $10^8$  a  $10^7$  esporas/ml (correspondiente a una concentración de  $10^8$  fragmentos viables/ml).
- Mezclar alícuotas iguales de la suspensión de esporas con el mutágeno MNNG al 0.02% y dejar reaccionar 60 minutos.
- Parar la reacción con cuatro partes de agua destilada estéril.
- Recuperar las esporas mutadas sobre la primera capa del medio e incubar a 28°C por 5 días y hasta entonces adicionar la segunda capa que contiene celulosa al 1% y glucosa al 0.05%.

TABLA 3.4: LETALIDAD DE BASIDIOSPORAS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION AL MUTAGENO MNNG (0.02%)

TIEMPO DE MUTACION (min)	SOBREVIVIENTES			LETALIDAD (%)
	NUMERO	LOGARITMO	%	
0	5.60 x 10	5.75	100.000	00.000
10	1.20 x 10	5.08	21.428	78.572
20	1.00 x 10	5.00	17.857	82.143
30	4.00 x 10	4.60	7.143	92.857
35	2.90 x 10	4.46	5.178	94.822
40	2.20 x 10	3.34	0.393	99.607
45	2.01 x 10	3.30	0.359	99.641
50	9.00 x 10	1.95	0.016	99.984
60	6.00 x 10	1.78	0.011	99.989

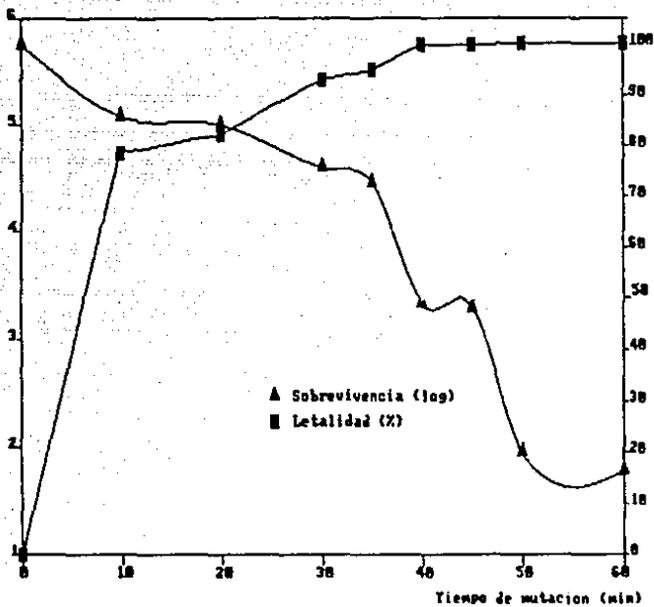


Fig. 3.2 Curva de letalidad de basidiosporas al someterlas a la acción del mutageno MNGG.

### 3.2 PRODUCCION DE MUTANTES ACELULOLITICAS (C-).

La producción de mutantes acelulolíticas se realizó utilizando las condiciones determinadas en las curvas de letalidad (para micelio monocariótico o basidiosporas). Para los experimentos de mutación se sometió la suspensión de micelio o esporas a la acción del mutágeno durante 60 minutos y posteriormente se inoculó 1 ml de la suspensión sobre el medio de recuperación. A continuación se incubaron las cajas petri a 28°C durante 15 días, para permitir el desarrollo miceliar. De los sobrevivientes obtenidos, se seleccionaron como posibles mutantes aquellas colonias que no desarrollaron halo en el medio de celulosa. Estas se conservaron en refrigeración en medio de extracto de malta. Posteriormente se evaluó en diferentes medios su capacidad para consumir celulosa.

#### 3.2.1 EXPERIMENTOS DE MUTACION CON MICELIO MONOCARIOTICO.

Para los experimentos de mutación se produjo el micelio monocariótico fragmentado (Materiales y Métodos 2.3.1), utilizando en forma alterna los monocariotes nh-1 y nh-4.

Con las condiciones determinadas en la curva de letalidad se realizaron inicialmente un total de 8 experimentos de mutación (Tabla 3.5). Cabe aclarar que los experimentos codificados como 1 y 2 no se reportan en esta parte del trabajo, ya que forman parte de un trabajo previo (Avilés Esquivel, M.E.: 1987).

**TABLA 3.5: PRODUCCION DE MUTANTES ACELULOLITICAS (C-) A PARTIR DE MICELIO MONOCARIOTICO (RECUPERACION SOBRE MEDIO DE DOBLE CAPA: SALES MINERALES-CMC).**

EXPERIMENTO NUMERO	MONOCARIOTE SOMETIDO A MUTACION	CAJAS INOCULADAS (No)	COLONIAS RECUPERADAS		
			FOR CAJA	FOR EXPERIMENTO	CHARACTER* (C-)
3	H1	400	20-30	10,000	88
4	H4	200	30-50	8,000	17
5	H1	400	10-20	6,000	26
6	H4	300	20-30	7,500	13
7	H1	300	10-20	4,500	50
8	H4	300	20-30	7,500	2
9	H1	300	100-200	45,000	26
10	H4	350	200-300	87,500	42

\* Las colonias de tipo (C-) se caracterizaron por la ausencia de halo o aclaramiento del medio de celulosa.

En los experimentos 3 al 8 se utilizó una suspensión de micelio fragmentado con una concentración inicial de  $1 \times 10^{10}$  fragmentos/ml, mientras que para los experimentos 9 y 10 ésta fue de  $1 \times 10^{11}$ . Por ello se observa un incremento en el número de colonias recuperadas por caja.

En la Tabla 3.5 se puede observar que el número total de colonias recuperadas es mayor para el monocariote nh-4. A pesar de ello, el número de colonias recuperadas con carácter (C-) es mayor para el monocariote nh-1.

Al mismo tiempo que se realizaron estos experimentos de mutación, se caracterizaron las posibles mutantes acelulolíticas. Durante dicha caracterización se encontró que el medio de recuperación podía ser modificado para aumentar su selectividad (Experimentos y Resultados 3.3.2). Por ello a partir del experimento de mutación número 11 se modificó el medio de recuperación en la primera capa. En vez de usar el medio de sales se usó un medio de DPMA al 0.5% (Materiales y Métodos 2.2.2).

Con el medio de recuperación modificado se realizaron un total de 7 experimentos de mutación, bajo las mismas condiciones que los primeros experimentos y con una concentración inicial de  $1 \times 10^{10}$  fragmentos/ml. En la Tabla 3.6 se observa que el número de colonias recuperadas por caja es muy semejante a los experimentos 3 al 8 (Tabla 3.5). Sin embargo, la cantidad de posibles mutantes recuperadas disminuye notablemente.

**TABLA 3.6: PRODUCCION DE MUTANTES ACELULOLITICAS (C-) A PARTIR DE MICELIO MONOCARIOTICO (RECUPERACION SOBRE MEDIO DE DOBLE CAPA: DPHA 0.05%-CHC).**

EXPERIMENTO NUMERO	MONOCARIOTE SOMETIDO A MUTACION	CAJAS INOCULADAS (No)	COLONIAS RECUPERADAS		
			POR CAJA	POR EXPERIMENTO	CARACTER* (C-)
11	H1	250	25-30	6.875	8
12	H4	200	20-30	5,000	10
13	H1	300	10-30	6,000	10
14	H4	300	20-35	8.250	24
15	H1	250	10-20	3,750	5
16	H4	300	20-35	8,250	5
17	H1	200	10-20	3,000	2

\* Las colonias de tipo (C-) se caracterizaron por la ausencia de halo o aclaramiento del medio de celulosa.

En Tabla 3.7, al comparar el número de posibles mutantes recuperadas se observa que cuando se usa como medio primera capa DPMA al 0.5%, este valor disminuye en una tercera parte aproximadamente (de 0.4505 a 0.1556 respectivamente). De lo anterior se concluye que la modificación realizada al medio de recuperación contribuye a que se reduzca significativamente la cantidad de cepas identificadas con acelulolíticas en el primer paso de la caracterización.

### 3.2.2 EXPERIMENTOS DE MUTACION CON BASIDIOSPORAS.

La razón principal de realizar en forma paralela mutaciones con micelio monocariótico y basidiosporas fue para comparar la proporción de posibles mutantes con respecto a las colonias recuperadas para ambos casos.

Con las condiciones determinadas en la curva de letalidad (Experimentos y Resultados 3.1.2) y con una concentración de  $10^6$  esporas/ml (cuantificadas al microscopio), se realizaron 3 experimentos de mutación. La recuperación se llevó a cabo sobre el medio de doble capa modificado (DPMA 0.5%-CHC).

Como se puede observar en la Tabla 3.8, la relación entre el número de posibles mutantes y el total de colonias recuperadas es semejante a las mutaciones con micelio monocariótico fragmentado (Tabla 3.6). Por ello se puede predecir que la probabilidad para obtener mutantes acelulolíticas (C-) posiblemente sea la misma tanto para micelio como para esporas (0.15% aproximadamente). Implicando a la vez que las ventajas y/o desventajas que presenta

TABLA 3.7: EFECTO DE LA COMPOSICION DE LA PRIMERA CAPA SOBRE LA IDENTIFICACION DE POSIBLES MUTANTES.

COMPOSICION DE LA PRIMERA CAPA*	SOBREVIVIENTES RECUPERADOS	CEPAS CARACTERIZADAS COMO MUTANTES (C-)	
		No.	(%)
SALES MINERALES	43,500	196	0.4505
DPMA (0.05%)	41,125	64	0.1556

- \* Experimentos considerados:  
 - Sales minerales: 3 al 8 (Tabla 5)  
 - DPMA (05%): 11 al 17 (Tabla 6).

**TABLA 3.8: PRODUCCION DE MUTANTES ACELULOLITICAS (C-) A PARTIR DE BASIDIOSPORAS (RECUPERACION SOBRE MEDIO DE DOBLE CAPA: DPMS 0.5%-CMC).**

EXPERIMENTO NUMERO	CAJAS INOCULADAS (No.)	COLONIAS RECUPERADAS		
		FOR CAJA	FOR EXPERIMENTO	CARACTER* (C-)
1	350	30-50	14,000	15
2	300	20-40	9,000	29
3	300	40-50	13,500	11
TOTAL	950	20-50	36,500	55

\* Las colonias con carácter (C-), corresponden aquellas que no aclaran el medio de celulosa.

el uso de cada material no influyen en la obtención de mutantes siempre y cuando se manejen las condiciones requeridas para cada caso.

### 3.3 CARACTERIZACION DE LAS POSIBLES MUTANTES ACELULOLITICAS.

Era importante conocer con la mayor veracidad, la capacidad que poseen para consumir celulosa las posibles mutantes aisladas en los experimentos previos. Por ello se avaluó el carácter (C-) por medio de resiembras sucesivas en el mismo medio de recuperación así como, en medios con diferente fuente de celulosa. De esta manera fue posible determinar las colonias con carácter (C-) por dos métodos de evaluación diferentes.

#### 3.3.1 EVALUACION DEL CARACTER (C-) POR RESIEMBRAS SUCESIVAS EN EL MEDIO DE RECUPERACION.

Para poder determinar la capacidad para consumir celulosa por cada posible mutante fue necesario propagarlas y conservarlas en un medio nutritivo (Extracto de Malta). Una vez aisladas y obtenido suficiente crecimiento miceliar se probó su capacidad para consumir la celulosa del medio. Para ello se realizaron resiembras sucesivas en el medio de doble capa, debido a la posibilidad de una evaluación errónea de la ausencia de halo. Esta se podía presentar en las cepas con elevada velocidad de crecimiento, que por lo general son de tipo celulolítico ya que al desarrollarse con mayor rapidez su crecimiento miceliar puede ocultar el halo formado inicialmente. Así, cada posible mutante

se probó en el medio de recuperación (utilizado para su obtención) en dos ocasiones más y por duplicado, evaluandose la formación de halo cada 2 días durante 10 días.

La totalidad de las cepas recuperadas en cada experimento de mutación fue sometida a esta evaluación, presentandose una disminución en la cantidad de cepas caracterizadas como (C-) después de cada resiembra (Tabla 3.9).

Considerando los experimentos 1 al 10, la cantidad de cepas con carácter (C-) disminuye de 370 con la evaluación inicial a 45 y 18 para la primera y segunda resiembra respectivamente. Por ello se puede concluir que la posibilidad de evaluar erróneamente un cepa por este método es bastante elevada. Sin embargo, en los experimentos del 11 al 17 en donde se utilizó el medio de recuperación modificado se observa que las 64 colonias con carácter (C-) en la evaluación inicial disminuyen a 7 y 2 para las resiembras sucesivas. Esto corrobora la mayor selectividad del medio de recuperación modificado.

En los experimentos de mutación con basidiosporas, la cantidad de colonias con carácter (C-) disminuye de 55 con la evaluación inicial a 8 para la primera resiembra y ninguna cepa (C-) después de la segunda evaluación. Estos resultados no permitieron determinar la probabilidad que existe para obtener mutantes (C-) al usar basidiosporas. Sin embargo, por las ventajas que presenta la obtención de micelio monocariótico se continuo realizando los experimentos de mutación con micelio.

TABLA 3.9: EVALUACION DEL CARACTER ACELULOLITICO (C-) POR RESIEMBRAS SUCESIVAS.

EXPERIMENTO NUMERO	MATERIAL SOMETIDO A MUTACION	COMPOSICION DE LA PRIMERA CAPA	COLONIAS CON CARACTER (C-)		
			EVALUACION INICIAL	PRIMERA RESIEMBRA	SEGUNDA RESIEMBRA
1	H1	Sales Minerales	61	8	4
2	H4		45	6	1
3	H1		88	2	1
4	H4		17	5	1
5	H1		26	4	2
6	H4		13	5	0
7	H1		50	0	0
8	H4		2	2	1
9	H1		26	7	5
10	H4		42	6	3
11	H1	DPMA (0.5%)	8	1	0
12	H4		10	0	0
13	H1		10	3	0
14	H4		24	2	1
15	H1		5	0	0
16	H4		5	1	1
17	H1		2	0	0
1	Basidiosporas		15	4	0
2	Basidiosporas		29	3	0
3	Basidiosporas		11	1	0

En la Tabla 3.10 se indica la nomenclatura dada a las cepas con carácter (C-), que fueron finalmente seleccionadas después de la segunda resiembra, en el medio de doble capa. La clave asignada esta compuesta por el número de colonia aislada como posible mutante, la letra y número siguientes corresponden al monocariote utilizado en cada experimento (H1 o H4) y la letra y número final corresponden al número de experimento de mutación.

### 3.3.2 EVALUACION DEL CARACTER (C-) MODIFICANDO EL MEDIO DE RECUPERACION EN LA PRIMERA CAPA.

Es necesario aclarar que en la medida en que se obtuvieron las posibles mutantes se llevó a cabo su caracterización. De esta manera, después de la evaluación por resiembras sucesivas en el medio de doble capa sin modificar (Experimentos 1 al 10), se detectó que la mayoría de las mutantes presentó un bajo desarrollo miceliar. Con el objeto de conocer si este comportamiento era ocasionado por falta de nutrientes, o bien por incapacidad para consumir celulosa, se modificó el medio de detección en la primera capa. Para ello se sustituyeron las sales minerales de la primera capa del medio por DPMA al 0.3% y 0.5%. Al mismo tiempo, se utilizó como medio control para detectar la formación de halo, el medio de doble capa de Sales Minerales-CMC.

En la Tabla 3.11 se presentan los resultados obtenidos. Para el medio control (Sales minerales - CMC) a los 5 días de incubación ninguna de las cepas desarrolló halo y a los 10 días solamente la cepa 23 H1-N1 formó halo celulolítico. Sin embargo,

**TABLA 3.10: CEPAS CON CARACTER ACELULOLITICO (C-) DESPUES DE LA SEGUNDA RESIEMBRA.**

EXPERIMENTO NUMERO	CEPAS CON CARACTER (C-)	
	CANTIDAD	CLAVE
1	4	8 H1-N1 23 H1-N1 56 H1-N1 61 H1-N1
2	1	9 H4-N2
3	1	6 H1-N3
4	1	11 H4-N4
5	2	18 H1-N5 21 H1-N5
8	1	2 H4-N8
9	5	6 H1-N9 14 H1-N9 20 H1-N9 22 H1-N9 26 H1-N9
10	3	33 H4-N10 37 H4-N10 40 H4-N10
14	1	24 H4-N14
16	1	2 H4-N16

TABLA 3.11: EFECTO DE LA COMPOSICION DE LA PRIMERA CAPA SOBRE LA FORMACION DE HALO CELULOLITICO\*

C E P A S		FORMACION DE HALO CELULOLITICO								
		COMPOSICION DE LA PRIMERA CAPA								
		SALES MINERALES			DPMA (0.3%)			DPMA (0.5%)		
		TIEMPO DE INCUBACION (DIAS)								
		5	10	20	5	10	20	5	10	20
8	H1-N1	-	-	+	-	+	+	-	+	+
23	H1-N1	-	+	+	-	+	+	-	+	+
56	H1-N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	H1-N1	-	-	+	+	+	+	+	+	+
9	H4-N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+
6	H1-N3	-	-	+	+	+	+	+	+	+
11	H4-N4	-	-	+	+	+	+	+	+	+
18	H1-N5	-	-	+	+	+	+	+	+	+
21	H1-N5	-	-	+	+	+	+	+	+	+
2	H4-N8	-	-	+	+	+	+	+	+	+
6	H1-N9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	H1-N9	-	-	+	-	+	+	+	+	+
20	H1-N9	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+
22	H1-N9	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+
26	H1-N9	-	-	+	-	+	+	+	+	+
33	H4-N10	-	-	+	-	+	+	+	+	+
37	H4-N10	-	-	+	-	+	+	+	+	+
40	H4-N10	-	-	+	+	+	+	+	+	+
24	H4-N14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	H4-N16	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* FORMACION DE HALO: + positivo  
 - negativo  
 -/+ difuso

para tiempos de incubación mayores de 10 días 13 de las cepas fueron capaces de consumir celulosa. Esto implica que para utilizar esta prueba como método de selección se requiere prolongar el tiempo de incubación a 20 días o más. En el medio de CMC enriquecido con DPMA se observó que a medida que se incrementa la concentración de nutrientes disminuye el tiempo de formación de halo (para las cepas de tipo celulolítico).

En la Tabla 3.12 se presenta en forma resumida la capacidad de cada cepa para formar halo (o consumir celulosa) en función de la composición del medio primera capa y del tiempo de incubación. Para las cepas correspondientes a los primeros experimentos de mutación se observó que las cepas 9 H4-N2, 20 H1-N9 y 22 H1-N9 tenían parcialmente bloqueada su capacidad para consumir celulosa. La única cepa de los primeros experimentos de mutación que presentó carácter acelulolítico total fue la 56 H1-N1.

Para los experimentos de mutación del 11 al 17, en donde la recuperación se realizó en el medio de doble capa modificado (debido a que con los resultados anteriores se determinó una mayor selectividad), al probar las dos cepas obtenidas en ambas concentraciones de DPMA se confirmó su carácter (C-). Sin embargo se observó que a diferencia de las demás cepas, éstas presentaron características de desarrollo miceliar muy pobre.

TABLA 3.12: INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DE LA PRIMERA CAPA SOBRE LA FORMACION DE HALO CELULOLITICO POR LAS POSIBLES MUTANTES.

FORMACION DE HALO	POSIBLES MUTANTES	CONDICIONES*	
		MEDIO PRIMERA CAPA	TIEMPO (DIAS)
+	61 H1-N1	DPMA 0.3%	5
	6 H1-N3		
	11 H4-N4		
	18 H1-N5		
	21 H1-N5		
	2 H4-N8		
	40 H4-N10		
	23 H1-N1	DPMA 0.5%	
	14 H1-N9		
	26 H1-N9		
33 H4-N10			
37 H4-N10			
	8 H1-N1	DPMA 0.3%	10
	6 H1-N9	DPMA 0.5%	
-/+	9 H4-N2	DPMA 0.5%	20
	20 H1-N9		
	22 H1-N9		
-	56 H1-N1		
	24 H4-N14		
	2 H4-N16		

\* Condiciones de identificación de halo celulolítico en el menor tiempo.

### 3.3.3 EVALUACION DEL CARACTER (C-) MODIFICANDO LA FUENTE DE CELULOSA.

Con el objeto de confirmar el carácter acelulolítico de las posibles mutantes fue necesario implementar una forma alterna para evaluar el carácter (C-). Para ello se uso como fuente de celulosa papel filtro colocado sobre medios base de:

- Agar agua
- Agar peptona al 0.05%
- Agar peptona al 0.1%

La prueba consistió en detectar diferencias de crecimiento debido a la presencia y ausencia de la fuente de carbono (Materiales y Métodos 2.6). Con el objeto de poder detectar las posibles limitantes de la prueba se utilizaron 6 cepas de tipo (C-) y 8 cepas de tipo silvestre (C+). De manera simultánea se probó nuevamente la capacidad de formación de halo de cada cepa en el medio de doble capa modificado (DPMA 0.5% - CMC). Además se consideró la incapacidad que presentaron algunas cepas para desarrollarse, por lo que se midió para todos los casos el crecimiento miceliar a los 25 días de incubación.

Como se observa en la Tabla 3.13 para el medio de doble capa modificado todas las cepas se comportaron como se había previsto, a pesar de que el tiempo de incubación se prolongo hasta 25 días. En el medio de papel filtro sin suplementos, no se modificó el desarrollo miceliar por ninguna de las cepas. Es decir la falta de nutrientes impide que se exprese la capacidad para consumir la celulosa. El comportamiento de la mayoría de las cepas sobre el

TABLA 3.13: CRECIMIENTO MICELIAR Y CARACTER ACELULOLITICO EN DIFERENTES MEDIOS.

C E P A S	CRECIMIENTO MICELIAR*/CARACTER ACELULOLITICO				TIPO
	MEDIO DOBLE CAPA (DPMA 0.5%- CMC)	AGAR PAPEL FILTRO			
		SIN SUPLEMENTOS	PEPTONA (0.05%)	PEPTONA (0.10%)	
<b>TESTIGOS</b>					
H1	3 / C+	2 / C-	3 / C+	4 / C+	Silvestre
H4	2 / C+	2 / C-	2 / C-	3 / C+	Silvestre
<b>SILVESTRES</b>					
8 H1-N1	3 / C+	2 / C-	3 / C+	4 / C+	Silvestre
6 H1-N3	2 / C+	2 / C-	3 / C+	4 / C+	Silvestre
11 H4-N4	2 / C+	2 / C-	3 / C+	4 / C+	Silvestre
33 H4-N10	2 / C+	2 / C-	3 / C+	4 / C+	Silvestre
37 H4-N10	2 / C+	2 / C-	3 / C+	4 / C+	Silvestre
40 H4-N10	2 / C+	2 / C-	3 / C+	4 / C+	Silvestre
<b>CARACTER C-</b>					
56 H1-N1	3 / C-	2 / C-	2 / C-	3 / C-	Total
9 H4-N2	2 / C-/+	1 / C-	2 / C-	2 / C-	Parcial
20 H1-N9	3 / C-/+	1 / C-	2 / C-	2 / C-	Parcial
22 H1-N9	3 / C-/+	2 / C-	2 / C-	2 / C-	Parcial
24 H4-N14	1 / C-	1 / C-	1 / C-	1 / C-	Def. met.
2 H4-N16	1 / C-	1 / C-	1 / C-	1 / C-	Def. met.

\* Crecimiento miceliar:

- 1 = nulo
- 2 = pobre
- 3 = bueno
- 4 = abundante

medio de Papel Filtro - Peptona al 0.05% fue similar al observado en el medio de doble capa, con excepción de las cepas H1, 9 H4-N2, 20 H1-N9 y 22 H1-N9 que se comportaron como acelulolíticas. Al aumentar la concentración de peptona al 0.1%, todas las cepas se comportaron de manera semejante al medio de doble capa, con la ventaja de presentar un desarrollo miceliar más vigoroso. La desventaja de este medio en comparación al de doble capa se fundamenta en la imposibilidad para detectar cepas con carácter acelulolítico parcial.

Con respecto a las cepas 24 H4-N14 y 2 H4-N16 se presentó nuevamente una falta de desarrollo miceliar, razón por la cual se consideró que estaban alteradas de alguna forma en su metabolismo debido posiblemente al proceso de mutación.

Como resultado de las evaluaciones realizadas se puede concluir que la evaluación del carácter (C-) se debe de realizar al inicio (cuando se tiene un gran número de cepas por probar) en el medio de Papel Filtro - Peptona al 0.1% debido a lo económico que resulta este tipo de medio. En tanto que la confirmación del carácter (C-) se debe de realizar usando el medio de doble capa modificado (DPMA 0.5% - CMC).

#### 3.4 SELECCION DE LAS CEPAS A MEJORAR GENETICAMENTE

Para seleccionar las cepas que serán mejoradas genéticamente es necesario definir las características que se desean obtener en la descendencia. Para ello se requiere considerar las eventuales alteraciones producidas por el agente mutagénico a la mutante

seleccionada y tratar de eliminarlas por complementación con la ayuda del monocariote apareante.

Para seleccionar la mutante acelulolítica se consideraron 2 características: la incapacidad para consumir celulosa y el desarrollo miceliar. Con los resultados obtenidos durante la evaluación del carácter (C-), se seleccionó la mutante 56 H1-N1 por ser la única cepa que no consumió la fuente de celulosa bajo las condiciones probadas. Además, presentó el desarrollo miceliar más abundante comparado con el resto de las mutantes (Tabla 3.13).

#### 3.4.1 SELECCION DEL MONOCARIOTE SILVESTRE COMPATIBLE

Dado que la velocidad de desarrollo de la mutante es lenta comparada con las cepas de tipo silvestre, se requería seleccionar para su apareamiento un monocariote con abundante desarrollo miceliar. Para ello se probó el crecimiento miceliar de 16 monocariotes de tipo silvestre (en la Tabla 2.1 de Materiales y Métodos se indican las principales características de cada cepa) sobre un medio a base de paja de trigo (Materiales y Métodos 2.8).

Los resultados obtenidos indican que los monocariotes denominados: Mo. 24, P2-IE, P4-nhi y 3004/H-26 fueron los que presentaron el desarrollo miceliar más vigoroso en paja de trigo (Tabla 3.14). Adicionalmente a un buen desarrollo vegetativo el monocariote a seleccionar debe de ser compatible con la mutante y dar origen a un dicariote con crecimiento vigoroso en paja y

**TABLA 3.14: CRECIMIENTO MICEMIAL DE MONOCARIOTES SILVESTRES (C+) SOBRE PAJA DE TRIGO.**

MONOCARIOTES	CRECIMIENTO MICELIAR
Mo. 3	1
Mo. 127	1
Mo. 6	2
Mo. 37	2
nh-11	2
nh-42	2
42 H1/Mo.12	2
42 H1/Mo.41	2
nh 2/H1-Gy.	2
Mo. 36	3
P3-IR	3
nh 1/H1-Gy.	3
Mo. 24	4
P2-IE	4
P4-nh1	4
3004/H-26	4

\* Crecimiento micelial:

- 1 = nulo
- 2 = pobre
- 3 = bueno
- 4 = abundante

buena fructificación. Asimismo, con el objeto de proteger la cepa desarrollada es conveniente que el dicariote seleccionado también presente esporulación deficiente en caso de ser posible (esto ayudaría a evitar posibles manipulaciones genéticas de las cepas obtenidas).

Así los 16 monocariotes silvestres fueron apareados con la mutante 56 H1-N1 para determinar su compatibilidad (Materiales y Métodos 4.1). Como se observa en la Tabla 3.15 las únicas cepas que no se aparearon con la mutante fueron la nh-11 y nh-42. Ello descartó la posibilidad de obtener descendencia con esporulación deficiente, debido a que estas cepas eran las únicas de tipo asporógeno.

Los 14 dicariotes obtenidos se inocularon en cajas petri que contenían paja de trigo para observar sus características de fructificación y recolectar sus esporas. Después de la inoculación las cajas se incubaron a 28°C en obscuridad hasta su total invasión con micelio. A continuación se expusieron a la luz para permitir la formación de primordios. Finalmente se incrementó la aereación y la humedad relativa para promover el desarrollo de los cuerpos fructíferos y su esporulación (Materiales y Métodos 5.1, 5.2 y 3.2). En la Tabla 3.16 se presenta el tiempo que requirió cada dicariote para formar esporoforos así como sus principales características morfológicas. Los dicariotes que produjeron esporoforos de tipo normal corresponden a los apareamientos entre la mutante 56 H1-N1 con las cepas: Mo. 6, Mo. 24 y 42 H1/Mo. 12.

**TABLA 3.15: COMPATIBILIDAD DE LA MUTANTE ACELULOLITICA  
 56 H1-N1 CON DIFERENTES MONOCARIOTES SILVESTRES.**

<b>APAREAMIENTOS                      (56 H1-N1 x -----)</b>	<b>COMPATIBILIDAD</b>
Mo. 3	+
Mo. 6	+
Mo. 24	+
Mo. 36	+
Mo. 37	+
Mo. 127	+
P2-IE	+
P3-IR	+
P4-nh1	+
3004/H-26	+
nh-1/H1-Gy.	+
nh-2/H1-Gy.	+
42 H1/Mo.12	+
42 H1/Mo.41	+
nh-11	-
nh-42	-

TABLA 3.16: FRUCTIFICACION DE LOS APAREAMIENTOS POSITIVOS CON LA MUTANTE 56 H1-N1.

DICARIOTES (56 H1-N1 x ___)	FRUCTIFICACION		
	TIEMPO (DIAS)	MORFOLOGIA*	
		FORMA	TAMANO
Mo. 3	26	a	a
Mo. 6	26	n	n
Mo. 24	22	n	n
Mo. 36	22	a	a
Mo. 37	23	a	a
Mo. 127	17	a	a
P2-IE	24	a	a
P3-IR	23	a	a
P4-nh1	23	a	a
3004/H-26	26	a	a
nh 1/H1-Gy.	23	n	a
nh 2/H1-Gy.	22	n	a
42 H1/Mo.12	23	n	n
42 H1/Mo.41	26	n	a

\* Morfologia:  
n = normal  
a = anormal

Como resultado de las pruebas realizadas se observó que la cepa Mo. 24 presentó las siguientes características:

- Vigoroso crecimiento en paja de trigo.
- Compatibilidad con la mutante 56 H1-N1.
- El dicariote resultante produce cuerpos fructíferos normales en un tiempo corto.

Por todo lo anterior el apareamiento de la cepa Mo. 24 con la mutante 56 H1-N1 fue seleccionado para llevar a cabo el mejoramiento genético.

### 3.5 MEJORAMIENTO GENETICO.

El mejoramiento genético se realizó con el objeto de obtener cepas capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. Es decir bloqueadas en su capacidad para consumir celulosa, con vigoroso desarrollo micelial y con capacidad para consumir lignina semejante a la cepa 8 x 3 (Cepa progenitora de la mutante 56 H1-N1). Para el mejoramiento genético el híbrido resultante de la cruce entre la mutante (C-) 56 H1-N1 y el monocariote silvestre Mo. 24, fue propagado para posteriormente seleccionar de su progenie aquellas cepas con carácter (C-).

#### 3.5.1 OBTENCION DE LA PROGENIE.

La progenie del dicariote portador del carácter acelulolítico (56 H1-N1 x Mo. 24) se obtuvo germinando las espores recolectadas de un cuerpo fructífero maduro (Materiales y

Métodos 4.1 y 4.2). El aislamiento de la progenie se realizó a partir de las esporas de dos diferentes cuerpos fructíferos. De esta manera se recuperaron dos poblaciones. Para la primera población se aislaron 204 cepas y 275 para la segunda población.

### 3.5.2 SELECCION DE MONOCARIOTES PROGENIE DE TIPO (C-).

La determinación del carácter (C-) en la progenie se llevó a cabo considerando los resultados obtenidos durante la evaluación del carácter de las mutantes (Experimentos y Resultados 3.3.3). Por ello se utilizó inicialmente el medio de Peptona - Papel filtro para descartar las cepas de tipo celulolítico. Las cepas de tipo (C-) se probaron posteriormente en el medio de DPMA - CMC.

La evaluación inicial del carácter (C-) para cada una de las poblaciones se realizó en el medio de peptona al 0.1% con papel filtro (Materiales y Métodos 2.6 y 2.7). La prueba se llevó a cabo dos veces, observándose su comportamiento cada 7 días durante 35 días.

En la primera evaluación se pretendía descartar a todas aquellas cepas que presentaran un marcado carácter celulolítico. Como se observa en la Tabla 3.17 después de esta primera evaluación se descartaron 131 y 188 cepas de tipo celulolítico en cada población respectivamente.

La segunda evaluación se realizó con el propósito de verificar y seleccionar las cepas de tipo (C-). En la Tabla 3.17

TABLA 3.17: EVALUACION DEL CARACTER ACELULOLITICO (C-) EN LA PROGENIE DEL DICARIOTE 56 H1-N1 x Mo. 24 SOBRE AGAR PEPTONA 0.1% - PAPEL FILTRO.

POBLACION	CEPAS AISLADAS (TOTAL)	CEPAS CON CARACTER (C-)				
		INICIALES	FINALES			
			NUMERO	CLAVE		
1	204	73	13	12	48	86
				18	68	92
				27	71	104
				32	74	
				33	84	
2	275	87	16	3	47	71
				5	49	72
				6	54	80
				18	55	92
				19	62	
				45	65	

se observa que después de esta evaluación únicamente se obtuvieron 13 cepas de tipo (C-) para la primera población y 16 para la segunda población. Los números indicados en la última columna de la Tabla 17 corresponden a las claves asignadas a las cepas de tipo (C-).

Las cepas que resultaron acelulolíticas en la evaluación inicial fueron probadas en el medio de DPMA (0.5%) - CMC. La prueba consistió en evaluar la posible formación de halo de las 29 cepas (C-). La evaluación se realizó cada 7 días durante 35 días.

Los resultados de la Tabla 3.18 indican que 5 y 8 cepas de cada población formaron halo a los 7 días de incubación. El resto de las cepas se comportaron como acelulolíticas durante toda la evaluación.

Comparando los resultados obtenidos en los medios a base de papel filtro y de CMC se observó que este último permitió descartar algunas cepas con cierta capacidad para consumir celulosa. Además de reducir el tiempo de detección de 35 a 7 días de incubación.

### 3.5.3 DEFINICION DEL NUMERO DE GENES INVOLUCRADOS EN EL CARACTER (C-).

Es importante determinar con la mayor exactitud posible la cantidad de cepas de tipo (C-) dentro de una población. Esta información permite calcular el número de genes involucrados en la segregación del carácter (C-) por medio de la fórmula:

**TABLA 3.18: FORMACION DE HALO CELULOLITICO POR LA PROGENIE DEL DICARIOTE 56 H1-N1 x No. 24 SOBRE DPMA 0.5%-CMC.**

POBLACION	CEPAS MONOCARIOTE (CLAVE)	FORMACION DE HALO (DPMA 0.5%-CMC)	COMPORTAMIENTO	
1	12 18 27 32 104	+	Silvestres	
	33 48 68 71 74 84 86 92	-	Acelulolíticas	
	2	3 5 6 47 49 65 71 80	+	Silvestres
		10 19 45 54 55 62 72 92	-	Acelulolíticas

en donde:

$n$  = número de genes

El valor que se obtiene de esta fórmula representa la fracción de la población que debe contener el carácter deseado.

Considerando la cantidad de cepas (C-) obtenidas en las dos poblaciones estudiadas, estas representan entre 3 y 4% del número total de colonias aisladas (8 cepas acelulolíticas en cada población con respecto a 204 y 275 colonias totales aisladas para la primera y segunda población respectivamente). Al comparar estos valores con los datos presentados en la Tabla 3.19 es factible predecir la participación de 5 genes en el carácter (C-) de esta progenie, ya que en este caso se esperaría un 3.125% de la población con carácter (C-).

Es importante que esta estimación del número de genes sea avalada por medio de una prueba estadística, que nos proporcione un rango de confiabilidad. La prueba estadística que se utiliza generalmente para determinar en forma confiable el número de genes involucrados en la segregación de un carácter determinado dentro de una progenie se conoce como  $\chi^2$  (Chi cuadrada). En esta prueba se compara la relación que existe dentro de una población entre el número total de colonias y las cepas de tipo (C-). Esta comparación se realiza considerando los valores teóricos que se esperarían para un número determinado de genes con respecto a los datos obtenidos experimentalmente. Dicha comparación se realiza de acuerdo a la siguiente fórmula:

**TABLA 3.19: PROPORCION ESPERADA DE UNA POBLACION CON EL CARACTER DESEADO DE ACUERDO AL NUMERO DE GENES INVOLUCRADOS.**

NUMERO DE GENES	VALORES DE $2^n$	PORCION DE LA POBLACION CON EL CARACTER DESEADO	
		FRACCION ( $1/2^n$ )	PORCENTAJE
1	2	1/2	50.000
2	4	1/4	25.000
3	8	1/8	12.500
4	16	1/16	6.250
5	32	1/32	3.125

$$X^2 = (O - e)^2 / e$$

en donde:

$X^2$  = Chi cuadrada

O = Valor observado

e = Valor esperado teóricamente

Finalmente el valor de  $X^2$  calculado se compara con respecto al valor de la Tabla de  $X^2$  para un grado de libertad. Si el valor calculado es menor que el de tablas se concluye que no existe diferencia significativa entre lo esperado y lo obtenido. Cabe aclarar que en la medida en que disminuye el valor de  $X^2$  aumenta el grado de confiabilidad con que la hipótesis es aceptada.

En la Tabla 3.20 se presentan los valores de  $X^2$  para el caso de que estuvieran 4, 5 o 6 genes involucrados en el carácter (C-). Analizando los resultados obtenidos, en la primera población se presentó la posibilidad de que fueran 4 o 5 genes los involucrados, siendo mayor la probabilidad para 5 genes debido a que el valor de  $X^2$  es menor. Sin embargo, para la segunda población y los datos de ambas poblaciones considerados conjuntamente, sólo es posible concluir que existan 5 genes involucrados en la expresión del carácter acelulolítico.

**TABLA 3.20: DETERMINACION DEL NUMERO DE GENES POR SEGREGACION DEL CARACTER (C-) EN LA PROGENIE DEL DICARIOTES 56 H1-N1 x Mo. 24.**

NUMERO DE GENES	SEGREGACION DE MONOCARIOTES (C-)				VALOR DE X <sup>2</sup> *
	VALOR ESPERADO		VALOR EXPERIMENTAL		
	RELATIVO (%)	ABSOLUTO	RELATIVO (%)	ABSOLUTO	
<u>Primera Población: monocariotes aislados 204</u>					
4	6.2500	13			1.92
5	3.1250	6	.....	3.92	8
6	1.5625	3			8.33
<u>Segunda Población: monocariotes aislados 275</u>					
4	6.2500	17			4.76
5	3.1250	9	.....	2.90	8
6	1.5625	4			4.00
<u>Ambas Poblaciones: monocariotes aislados 479</u>					
4	6.2500	29			5.82
5	3.1250	15	.....	3.34	16
6	1.5625	7			11.57

\* Valores de X<sup>2</sup>, 3.84 indican una diferencia significativa entre lo esperado y lo obtenido experimentalmente.

### 3.5.4 DETERMINACION DE LOS TIPOS DE COMPATIBILIDAD DE LA PROGENIE (C-).

La determinación de los tipos de compatibilidad se realizó con el objeto de clasificar las cepas (C-) en los cuatro tipos de compatibilidad. Con esta información es posible hibridizar las cepas de cada uno de los grupos compatibles (progenitores o recombinantes) para obtener cepas dicarióticas. Las cepas dicarióticas en comparación con las monocarióticas presentan la ventaja de tener un desarrollo micelial más rápido y vigoroso. Además, por lo general son capaces de producir cuerpos fructíferos.

Los tipos de compatibilidad se determinaron apareando en primer lugar las cepas (C-) con las cepas progenitoras S6 H1-N1 y Mo. 24 (Materiales y Métodos 4.1). Las cepas (C-) cuyo apareamiento fue positivo (formaron un dicariote) con la mutante S6 H1-N1 corresponden al tipo de compatibilidad Mo. 24, mientras que las cepas de tipo S6 H1-N1 fueron aquellas que se aparearon positivamente con la cepa Mo. 24. De esta manera se identificaron las cepas con tipos de compatibilidad progenitores. Las cepas cuyos apareamientos resultaron negativos en ambos casos (no formaron dicariotes) corresponden al grupo de recombinantes. Su tipo de compatibilidad dentro de este grupo se determina apareando una de ellas con el resto de las cepas. Los apareamientos positivos indican que la cepa pertenecan al grupo III y los negativos al grupo IV.

En la Tabla 3.21 se presenta la clasificación de la progenie acelulolítica de las dos poblaciones en los cuatro tipos de compatibilidad. Para la primera población las cepas con clave 68 y 71 pertenecen al tipo progenitor 56 H1-N1 y las cepas 33 y 48 pertenecen al tipo progenitor Mo. 24. Las cepas restantes (74, 84, 86 y 92) pertenecen al grupo de los recombinantes. Su tipo de compatibilidad se determinó apareando la cepa 84 con las cepas 74, 86 y 92. Las cepas que formaron dicariotes fueron la 74 y 86 por lo que pertenecen al tipo III. Consecuentemente las cepas 84 y 92 pertenecen al tipo IV de los recombinantes.

En la segunda población la distribución de las cepas en los 4 tipos de compatibilidad fue de 4 para los progenitores y 4 para los recombinantes. Dentro de los progenitores 3 fueron de tipo 56 H1-N1 (45, 54 y 62) y 1 de tipo Mo. 24 (72); para los recombinantes 1 fue de tipo III (92) y 3 fueron de tipo IV (18, 19 y 55).

### 3.5.5 APAREAMIENTOS ENTRE MONOCARIOTES COMPATIBLES CON DIFERENTE CAPACIDAD PARA CONSUMIR CELULOSA.

Con el objeto de observar la posibilidad que existe para obtener dicariotes acelulolíticos se hibridizaron cepas monocarióticas de tipo progenitor o recombinante con carácter (C-) y (C+). En la Tabla 3.22 se da una lista de las cepas monocarióticas de cada población que se utilizaron para la obtención de dicariotes. En la Tabla 3.23 se presenta de manera resumida la cantidad de apareamientos realizados en cada caso.

**TABLA 3.21: CLASIFICACION DE LOS MONOCARIOTES ACELULOLITICOS EN LOS CUATRO TIPOS DE COMPATIBILIDAD.**

TIPOS DE COMPATIBILIDAD	MONOCARIOTES ACELULOLITICOS			
	POBLACION 1		POBLACION 2	
	CLAVE	TOTAL	CLAVE	TOTAL
<b>PROGENITORES</b>				
56 H1-N1	68	2	45	3
	71		54	
			62	
Mo. 24	33	2	72	1
	48			
<b>RECOMBINANTES</b>				
III	74	2	92	1
	86			
IV	84	2	18	3
	92		19	
			55	

**TABLA 3.22: MONOCARIOTES UTILIZADOS PARA HIBRIDIZAR Y SELECCIONAR DICARIOTES ACELULOLITICOS.**

TIPOS DE COMPATIBILIDAD	CARACTER	MONOCARIOTES (CLAVES)*	
		POBLACION 1	POBLACION 2
<b>PROGENITORES</b>			
56 H1-N1	C-	68, 71	45, 54, 62
	C+	32, 37, 44	2, 5, 29, 46, 49 53, 57, 59, 71, 88
Mo. 24	C-	33, 48	72
	C+	10, 18, 65, 81	20, 40, 47, 50, 74
<b>RECOMBINANTES</b>			
III	C-	74, 86	92
	C+	26, 69	3, 16
IV	C-	84, 92	18, 19, 55
	C+	12, 56, 73, 104	6, 12, 14, 39, 65 73, 77, 80

\* Monocariotes descendientes del dicariote 56 H1-N1 x Mo. 24.

TABLA 3.23: APAREAMIENTOS ENTRE MONOCARIOTES CELULOLITICOS Y ACELULOLITICOS.

POBLACION	APAREAMIENTOS		
	TIPOS DE COMPATIBILIDAD	CARACTER	CANTIDAD REALIZADA
1	Progenitor (56 H1-N1 x Mo. 24)	C- x C-	4
		C- x C+	14
		C+ x C+	12
	Recombinante (III x IV)	C- x C-	4
		C- x C+	12
		C+ x C+	8
2	Progenitor (56 H1-N1 x Mo. 24)	C- x C-	3
		C- x C+	25
		C+ x C+	50
	Recombinante (III x IV)	C- x C-	3
		C- x C+	14
		C+ x C+	16

### 3.5.6 SELECCION DE DICARIOTES ACELULOLITICOS.

Una vez obtenidos los 54 dicariotes de la primera población y 111 de la segunda población se procedió a determinar su capacidad para consumir celulosa. Para ello, la evaluación se realizó utilizando dos métodos con el objeto de comparar los resultados obtenidos. La primera evaluación se llevó a cabo en el medio de poptona - papel filtro cada 7 días durante 35 días. La segunda evaluación se realizó en el medio de DPMA - CMC a los 7 y 14 días de incubación.

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 3.24, 3.25, 3.26 y 3.27. Cabe señalar que en las dos evaluaciones realizadas un número elevado de cepas se comportaron de manera diferente en ambos métodos. Es decir, parte de las cepas se comportaron como (C+) en el medio de papel filtro y como (C-) en el medio de celulosa. En este caso posiblemente en el medio de CMC el halo se formó durante los primeros días de incubación y debido al abundante desarrollo miceliar, este fue ocultado y la cepa se evaluó erróneamente como (C-). También se presentó el caso contrario, en donde las cepas se evaluaron como (C-) en el medio de papel y como (C+) en el medio de celulosa. Este tipo de comportamiento posiblemente se debe a que el papel filtro es una fuente de celulosa menos disponible que la CMC debido a que la celulosa fue sometida a un tratamiento ácido (tratamiento Walseth). Ello explica la razón por la cual la evaluación en papel requiere de 7 a 35 días en tanto, que la evaluación en el medio de CMC requiere solamente de 7 a 14 días. Por ello es

**TABLA 3.24: EVALUACION DEL CARACTER ACELULOLITICO/CELULOLITICO DE LOS APAREAMIENTOS ENTRE PROGENITORES (PRIMERA POBLACION) EN MEDIO CON PAPEL FILTRO Y CON CMC<sup>a</sup>.**

MONOCARIOTES TIPO Mo. 24 (CLAVE)	CARACTER DE MONOCARIOTES APAREADOS	MONOCARIOTES TIPO 56 H1-N1 (CLAVE)				
		68	71	32	37	44
		C-			C+	
33	C-	C-	C-	C-	C+	C+
48		C-	C-	C+(-)	C+(-)	C+
10	C+	C+	C+	C-(+)	C+	C+
18		C+	C+(-)	C-(+)	C-	C+(-)
65		C+	C+	C+	C+(-)	C+
81		C+	C+	C+	C+	C+(-)

<sup>a</sup> El signo indicado entre parentesis corresponde al carácter del dicariote en medio de DPMA 0.5% - CMC en caso de haberse registrado diferente resultado en medio de peptona - papel filtro.

**TABLA 3.25: EVALUACION DEL CARACTER ACELULOLITICO/CELULOLITICO DE LOS APAREAMIENTOS DE TIPO RECOMBINANTE (PRIMERA POBLACION) EN MEDIO CON PAPEL FILTRO Y CON CMC\*.**

MONOCARIOTES RECOMBINANTES	CARACTER DE MONOCARIOTES APAREADOS	MONOCARIOTES RECOMBINANTES TIPO III			
		74	86	27	69
TIPO IV (CLAVE)		C-		C+	
84	C-	C-	C-	C-(+)	C+
92		C-	C-	C-	C-(+)
12	C+	C+	C+	C-(+)	C+
55		C+	C-(+)	C-(+)	C+
73		C+	C-(+)	C-	C+
104		C+	C-(+)	C-(+)	C-(+)

\* El signo indicado entre paréntesis corresponde al carácter del dicariote en medio de DPMA 0.5%-CMC en caso de haberse registrado diferente resultado en medio de peptona - papel filtro.

TABLA 3.26: EVALUACION DEL CARACTER ACELULOLITICO/CELULOLITICO DE LOS APAREAMIENTOS DE TIPO PROGENITOR (SEGUNDA POBLACION) EN MEDIO CON PAPEL FILTRO Y CON CMC<sup>a</sup>.

MONOCARIOTES TIPO	CARACTER DE MONOCARIOTES	MONOCARIOTES			TIPO	Mo. 24	
		72	20	40		47	50
(CLAVE)	APAREADOS	C-			C+		
45	C-	C-	C+	C+	C+	C+	C+
54		C-	C+	C+	C+	C+	C+
62		C-	C+	C+	C-	C+	C+
2	C+	C+	C+	C+(-)	C+	C+	C+
5		C+	C+	C+	C-(+)	C+	C+
29		C+	C+	C+	C+	C+	C+
46		C+	C+	C+	C+	C+	C+
49		C+	C+(-)	C+(-)	C-(+)	C+	C-
53		C+	C+	C+	C+	C+	C+
57		C+	C+	C+	C+	C+	C+
59		C+	C+	C-	C+	C+	C+
71		C-(+)	C-(+)	C-	C-(+)	C-(+)	C+
88		C+	C+	C+	C+	C-(+)	C+

<sup>a</sup> El signo indicado entre paréntesis corresponde al carácter del dicariote en medio DFMA 0.5%-CMC cuando el resultado fue diferente en medio peptona - papel filtro.

TABLA 3.27: EVALUACION DEL CARACTER ACELULOLITICO/CELULOLITICO DE LOS APAREAMIENTOS DE TIPO RECOMBINANTE (SEGUNDA POBLACION) EN MEDIO CON PAPEL FILTRO Y CON CMC<sup>a</sup>.

MONOCARIOTES RECOMBINANTES TIPO IV (CLAVE)	CARACTER DE MONOCARIOTES APAREADOS	MONOCARIOTES RECOMBINANTES TIPO III		
		92	3	16
		C-		C+
18	C-	C-	C-(+)	C+
19		C-	C-(+)	C+(-)
55		C-	C-(+)	C+
6	C+	C+	C-(+)	C+
12		C+	C+	C+
14		C+	C+(-)	C+(-)
39		C+	C+	C+
65		C+	C+	C-
73		C-	C+	C+
77		C+	C-(+)	C+
80		C-(+)	C+	C+

<sup>a</sup> El signo indicado entre paréntesis corresponde al carácter del dicariote en medio de DPMA 0.5% - CMC en caso de haberse registrado diferente resultado en medio de peptona-papel filtro.

factible que si el tiempo de incubación en el medio de papel se hubiera prolongado más de 35 días, este tipo de cepas posiblemente consumirían la celulosa del papel de igual forma que consumieron la CMC. Considerando los problemas anteriores se determinaron como dicariotes acelulolíticos únicamente a las cepas que en ambas evaluaciones se comportaron como acelulolíticas.

En general se observó que los dicariotes provenientes de monocariotes con carácter (C-) siempre son de tipo acelulolítico. Para el caso de los dicariotes resultantes de apareamientos de tipo C- x C+ se observó que únicamente 4 de los 64 dicariotes fueron de tipo acelulolítico. De manera semejante para los dicariotes resultantes de apareamientos C+ x C+ solamente se obtuvieron 6 dicariotes acelulolíticos de los 86 dicariotes probados. Estos resultados indican que existe una probabilidad muy baja de obtener dicariotes acelulolíticos a partir de apareamientos que involucren monocariotes de tipo (C+).

En la Tabla 3.28 se presenta una lista de los dicariotes que presentaron carácter (C-) en los dos métodos de evaluación. Al mismo tiempo se indica el carácter de los monocariotes apareados.

### 3.6 COMPORTAMIENTO DE LOS DICARIOTES (C-) SOBRE PAJA DE TRIGO.

Una vez que se obtuvieron dicariotes con carácter acelulolítico era importante evaluar la forma en que se desarrollan y consumen los componentes de un desperdicio

**TABLA 3.28: DICARIOTES ACELULOLITICOS (C-) EN LOS DOS METODOS DE EVALUACION\*.**

ORIGEN (CARACTERES APAREADOS)	TOTAL DE APAREAMIENTOS REALIZADOS	CEPAS ACELULOLITICAS	
		NUMERO TOTAL	CLAVE
C- x C-	14	14	45 x 72
			54 x 72
			62 x 72
			68 x 33
			68 x 48
			71 x 33
			71 x 48
			74 x 84
			74 x 92
			86 x 84
			86 x 92
			92 x 18
			92 x 19
92 x 55			
C- x C+	65	4	27 x 92
			32 x 33
			62 x 47
			92 x 73
C+ x C+	86	6	16 x 65
			27 x 73
			37 x 18
			49 x 74
			59 x 40
			71 x 40

Métodos de detección:  
 - Peptona 0.1% - papel filtro.  
 - DPNA 0.5% - CHC.

agropecuaria. Ello permitiría determinar objetivamente las ventajas y/o desventajas de someter una cepa a un tratamiento mutagénico y posterior mejoramiento genético.

### 3.6.1 EVALUACION COMPARATIVA DEL DESARROLLO MICELIAR DE LOS DICARIOTES (C-) EN MEDIO DE PEPTONA Y DE PAJA DE TRIGO.

Los 24 dicariotes acelulolíticos se evaluaron en medios de peptona - paja de trigo y peptona sola (Materiales y Métodos 2.2.7 y 2.2.8). Esto se realizó con el objeto de conocer y comparar la capacidad de cada cepa para desarrollarse en paja de trigo y en medio de peptona.

En la Tabla 3.29 se presentan los resultados de dicha evaluación a los 7 días de incubación a 28°C. Los datos presentados son el resultado de 3 mediciones. En la última columna de la tabla se presentan las diferencias en crecimiento observadas al comparar el desarrollo miceliar en el medio de paja con respecto al de peptona (las diferencias en crecimiento se determinaron por medio de una Prueba "T"). En la evaluación de los 24 dicariotes probados se observó que 14 presentaron mayor desarrollo miceliar sobre el medio de paja (con una P=95 o P=99%); 7 se desarrollaron de igual forma en ambos medios y 3 presentaron menor desarrollo miceliar en el medio de paja que en peptona.

Con base en los resultados obtenidos, en la Tabla 3.30 se presenta una clasificación de los dicariotes (C-) de acuerdo a su desarrollo miceliar sobre el medio de paja de trigo. Dentro de

TABLA 3.29: EVALUACION DEL DESARROLLO MICELIAR DE LOS DICARIOTES ACELULOLITICOS SOBRE MEDIO DE PAJA Y DE PEPTONA.

ORIGEN (CARACTERES APAREADOS)	CEPAS ACELULO- LITICAS	DESARROLLO MICELIAR (cm)		CRECIMIENTO RELATIVO (PAJA/PEPTONA)
		PAJA	PEPTONA	
C- x C-	45 x 72	3.93 ± 0.11	3.73 ± 0.06	Igual
	54 x 72	3.76 ± 0.11	3.26 ± 0.11	Mayor (P=99%)
	62 x 72	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	Igual
	68 x 33	3.70 ± 0.00	2.73 ± 0.25	Mayor (P=99%)
	68 x 48	3.73 ± 0.25	3.56 ± 0.11	Igual
	71 x 33	3.66 ± 0.23	3.06 ± 0.11	Mayor (P=95%)
	71 x 48	4.00 ± 0.00	3.06 ± 0.11	Mayor (P=99%)
	74 x 84	3.43 ± 0.06	2.50 ± 0.10	Mayor (P=99%)
	74 x 92	3.03 ± 0.15	2.16 ± 0.20	Mayor (P=99%)
	86 x 84	4.10 ± 0.10	3.87 ± 0.15	Igual
	86 x 92	3.47 ± 0.06	4.53 ± 0.06	Menor (P=99%)
	92 x 18	3.86 ± 0.15	3.53 ± 0.06	Mayor (P=95%)
	92 x 19	4.03 ± 0.06	3.46 ± 0.06	Mayor (P=99%)
92 x 55	3.66 ± 0.15	3.73 ± 0.06	Igual	
C- x C+	27 x 92	4.23 ± 0.21	4.10 ± 0.10	Igual
	32 x 33	4.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	Mayor (P=99%)
	62 x 47	3.20 ± 0.00	3.70 ± 0.00	Menor (P=99%)
	92 x 73	2.40 ± 0.10	1.00 ± 0.00	Mayor (P=99%)
C+ x C+	16 x 65	3.63 ± 0.15	4.26 ± 0.11	Menor (P=99%)
	27 x 73	4.16 ± 0.15	3.60 ± 0.10	Mayor (P=99%)
	37 x 18	3.20 ± 0.20	3.50 ± 0.00	Igual
	49 x 74	4.43 ± 0.11	3.33 ± 0.06	Mayor (P=99%)
	59 x 40	4.43 ± 0.11	3.50 ± 0.00	Mayor (P=99%)
	71 x 40	4.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	Mayor (P=99%)

Nota: La diferencias observadas en crecimiento miceliar en el medio de paja con respecto al de peptona se determinaron por medio de una Prueba T.

**TABLA 3.30: CLASIFICACION Y SELECCION DE LOS DICARIOTES ACELULOLITICOS DE ACUERDO A SU DESARROLLO EN PAJA.**

DESARROLLO MICELIAR EN PAJA (cm)	CRECIMIENTO RELATIVO (PAJA/PEPTONA)	DICARIOTES ACELULOLITICOS	
POBRE (2.40 - 3.20)	Menor (P=99%)	62 x 47	
	Igual	37 x 18*	
	Mayor (P=99%)	74 x 92* 92 x 73*	
BUENO (3.43 - 4.00)	Menor (P=99%)	16 x 65* 86 x 92*	
	Igual	45 x 72 62 x 72 68 x 48 92 x 55*	
		Mayor (P=95%)	71 x 33 92 x 19
		Mayor (P=99%)	32 x 33 54 x 72 68 x 33 71 x 40 71 x 48* 74 x 84
		ABUNDANTE (4.03 - 4.43)	Igual
	Mayor (P=99%)		27 x 73* 49 x 74 59 x 40* 92 x 19

\*Cepas seleccionadas.

Nota: La diferencias observadas en crecimiento miceliar en el medio de paja con respecto al de peptona se determinaron por medio de una Prueba T.

cada grupo se clasificaron nuevamente las cepas, considerando las diferencias en crecimiento observadas al comparar el medio de paja con respecto al medio de peptona sólo. Como se puede observar las características de desarrollo de los 24 dicaríotes (C-) son muy distintas. Por ello se eligieron cepas de cada uno de los grupo obtenidos para evaluar la forma en que son consumidos los componentes de la lignocelulosa. En la Tabla 3.30 se indican con un asterisco los 11 dicaríotes (C-) seleccionados para la siguiente evaluación.

### 3.6.2 PROPAGACION DE LOS DICARIOTES (C-) EN PAJA DE TRIGO.

La propagación de los dicaríotes (C-) en paja de trigo se realizó con la finalidad de evaluar la capacidad de cada cepa para consumir los componentes de la lignocelulosa. Al mismo tiempo se incluyeron 2 cepas testigo con el objeto de observar las ventajas y/o desventajas del proceso de mutación y mejoramiento genético por el cual se obtuvieron los dicaríotes (C-). Las cepas testigo utilizadas fueron los dicaríotes 8 x 3 y 56 H1-N1 x Mo. 24. El primero corresponde al dicaríote progenitor de la mutante 56 H1-N1 y el segundo al dicaríote progenitor de los 11 dicaríotes acelulolíticos.

La propagación de las cepas en paja de trigo requiere la producción de la semilla o inóculo de grano de cada cepa. Para ello las cepas se inocularon en grano de trigo previamente hervido y esterilizado (Materiales y Métodos 2.5.1) y finalmente se incubaron a 28°C durante 8 días para permitir su invasión con

micelio vegetativo. Una vez obtenido el inóculo de grano se acondiciona la paja de trigo e inocula con cada una de las cepas (Materiales y Métodos 2.5.2). Para observar las diferencias en crecimiento micelial de las cepas probadas, este fue evaluado en cada muestreo antes de secar el material. Esta evaluación se realizó de manera subjetiva por medio de una escala hedónica. A los 25 días de incubación el desarrollo micelial de las cepas controles fue más abundante; para 4 cepas fue bueno (27 x 73, 27 x 92, 59 x 40 y 86 x 84); con 3 cepas fue muy pobre (71 x 48, 86 92 y 92 x 55), mientras que las 4 cepas restantes no presentaron desarrollo micelial alguno (16 x 65, 37 x 18, 74 x 92 y 92 x 73) razón por la cual no se realizaron los análisis químicos para estas últimas cepas. A los 50 días de incubación las cepas control al igual que las cepas 27 x 73, 27 x 92 y 59 x 40 presentaron el mayor desarrollo micelial; para 4 cepas fue bueno y las cepas que no habían crecido al primer tiempo presentaron un desarrollo micelial muy pobre (Tabla 3.31).

### 3.6.3 EVALUACION QUIMICA DE LOS PATRONES DE CONSUMO DE LOS DICARIOTES (C-) SOBRE PAJA DE TRIGO.

Una vez evaluado el desarrollo micelial de los 11 dicariotes (C-) y las dos cepas testigo, la paja de trigo se secó a 60°C hasta peso constante. Posteriormente se analizó el sustrato en términos de cenizas (A.O.A.C.), lignina (Método de Effland) y carbohidratos por medio de una hidrólisis total con ácido sulfúrico al 67% y posterior determinación de glucanos (Método de Klein-Weissman) y xilanos (Método de Tracey). Cada determinación

**TABLA 3.31: DESARROLLO MICELIAR DE DICARIOTES ACELULOLITICOS EN  
PAJA DE TRIGO.**

C R P A S	DESARROLLO MICELIAR*	
	----- TIEMPO DE INCUBACION (DIAS)	
	25	50
<b>TESTIGOS</b>		
8 x 3	4	4
56 H1-N1 x Mo.24	4	4
<b>DICARIOTES C-</b>		
16 x 65	1	2
27 x 73	3	4
27 x 92	3	4
37 x 18	1	2
59 x 40	3	4
71 x 48	2	3
74 x 92	1	2
86 x 84	3	3
86 x 92	2	3
92 x 55	2	3
92 x 73	1	2

\* Desarrollo miceliar

- 1 = nulo
- 2 = pobre
- 3 = bueno
- 4 = abundante

se realizó por triplicado para las dos replicas de cada cepa en cada tiempo de incubación. Además se analizó la paja de trigo original (paja de trigo sin ser hidratada y pasteurizada) y la paja de trigo sin inocular (denominada como testigo de paja al tiempo 0), tomando de igual forma dos muestras de cada tipo que se analizaron por triplicado.

El análisis de la paja de trigo original con respecto a la paja de trigo al tiempo 0 se realizó para determinar la pérdida de componentes originada por los tratamientos de hidratación y pasteurización. La determinación de humedad de cantidades iguales de ambas muestras reveló que la paja original presentó un 10.1% de humedad y la pérdida en peso de la paja tratada fue de 14.37%.

El análisis proximal de la paja original fue el siguiente (expresado en %): ceniza  $8.53 \pm 0.08$ ; lignina  $19.34 \pm 0.19$ ; glucanos  $53.36 \pm 0.95$  y xilanos  $28.24 \pm 0.41$ . En tanto que para la paja tratada fue: cenizas  $4.35 \pm 0.04$ ; lignina  $20.70 \pm 0.12$ ; glucanos  $49.54 \pm 0.0$  y xilanos  $25.85 \pm 0.41$ . Al comparar ambas pajas y correlacionarlas con la pérdida en peso debida a la hidratación y pasteurización se calculó la pérdida de cada componente. Así se determinó que el tratamiento de hidratación y pasteurización dado a la paja ocasionó una pérdida de 56% en cenizas, 8% en lignina, 20% en glucanos y 21% en xilanos.

En las Tablas 3.32 y 3.33 se reporta la composición del sustrato en base seca al tiempo 0 y después de 25 y 50 días de incubación con las diferentes cepas. La interpretación de los resultados se realizó por medio de un análisis de varianza para

**TABLA 3.32: COMPOSICION DE LA PAJA DE TRIGO DESPUES DE 25 DIAS DE INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.**

C E P A S	COMPOSICION (g/100 g de paja seca)			
	CENIZAS	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
			GLUCANOS	XILANOS
<b>TESTIGOS</b>				
<b>Paja</b>				
(tiempo 0)	4.23 ± 0.23	20.34 ± 0.33	50.17 ± 1.36	26.73 ± 0.53
8 x 3	6.17 ± 0.25	18.39 ± 0.23	47.44 ± 0.42	26.42 ± 0.18
56 H1-N1 x Mo 24	6.39 ± 0.40	18.89 ± 0.38	38.42 ± 0.84	25.33 ± 0.37
<b>DICARIOTES (C-)</b>				
16 x 65	ND	ND	ND	ND
27 x 73	5.02 ± 0.09	22.39 ± 0.36	46.90 ± 0.94	26.02 ± 0.34
27 x 92	6.18 ± 0.35	21.68 ± 0.33	48.13 ± 1.00	24.55 ± 0.35
37 x 18	4.98 ± 0.14	20.19 ± 0.67	51.50 ± 0.74	25.85 ± 0.37
59 x 40	5.44 ± 0.24	19.81 ± 0.66	42.49 ± 1.15	25.43 ± 0.47
71 x 48	6.38 ± 0.10	23.92 ± 0.95	39.93 ± 0.82	23.85 ± 0.34
74 x 92	5.02 ± 0.17	20.08 ± 0.19	43.89 ± 0.84	25.03 ± 0.19
86 x 84	ND	ND	ND	ND
86 x 92	ND	ND	ND	ND
92 x 55	6.11 ± 0.17	21.27 ± 0.91	46.49 ± 0.61	23.49 ± 0.46
92 x 73	ND	ND	ND	ND

ND = No determinado

TABLA 3.33: COMPOSICION DE LA PAJA DE TRIGO DESPUES DE 50 DIAS DE INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.

C E P A S	COMPOSICION (g/100 g de paja seca)			
	CENIZAS	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
			GLUCANOS	XILANOS
<b>TESTIGOS</b>				
Paja	4.23 ± 0.23	20.34 ± 0.33	50.17 ± 1.36	26.73 ± 0.53
8 x 3	6.69 ± 0.13	17.83 ± 0.32	44.04 ± 1.99	18.72 ± 0.60
56 H1-N1 x Mo 24	6.88 ± 0.31	17.04 ± 0.53	47.54 ± 0.87	18.42 ± 0.56
<b>DICARIOTES (C-)</b>				
16 x 65	5.79 ± 0.06	19.98 ± 0.11	53.63 ± 1.30	18.74 ± 0.55
27 x 73	5.51 ± 0.05	20.96 ± 0.08	42.38 ± 0.98	16.65 ± 0.32
27 x 92	6.45 ± 0.31	20.61 ± 0.15	50.08 ± 1.25	19.09 ± 0.28
37 x 18	5.40 ± 0.20	18.53 ± 1.28	54.23 ± 1.08	16.39 ± 0.30
59 x 40	6.05 ± 0.23	15.66 ± 0.27	50.30 ± 0.55	17.99 ± 0.34
71 x 48	6.41 ± 0.19	19.61 ± 0.30	51.14 ± 1.53	15.61 ± 0.23
74 x 92	6.25 ± 0.17	20.14 ± 1.12	53.00 ± 0.46	16.00 ± 0.08
86 x 84	4.53 ± 0.17	20.46 ± 0.21	41.93 ± 0.77	17.36 ± 0.48
86 x 92	6.69 ± 0.03	16.34 ± 0.27	49.48 ± 0.66	18.25 ± 0.34
92 x 55	6.31 ± 0.24	19.91 ± 0.42	52.97 ± 2.16	18.83 ± 0.18
92 x 73	4.97 ± 0.07	20.59 ± 0.42	53.03 ± 1.09	16.06 ± 0.20

observar si existían diferencias en cada componente debidas al desarrollo micelial de las diferentes cepas. En todos los casos se presentaron diferencias altamente significativas entre la paja sin inocular y la paja inoculada por las diferentes cepas. Se aplicó entonces un prueba de Duncan para determinar las cepas que consumieron la mayor, o menor cantidad de cada uno de los componentes de la paja. (En el Anexo 2 se presentan los resultados del análisis estadístico).

Cuando los resultados se expresan en porcentajes de cada componente (Tablas 3.32 y 3.33), la proporción de cenizas es la única que aumenta con el desarrollo vegetativo. Este comportamiento indica que los otros componentes del sustrato están siendo consumidos, incrementandose así la proporción o porcentaje de cenizas. Por ello no es posible determinar el consumo de cada componente del sustrato considerando únicamente los datos de composición del sustrato. Esto se logra calculando los porcentajes de pérdida de cada componente en base constante, es decir con respecto al contenido de cenizas. Este tipo de calculos es semejante al obtenido por medio de la pérdida en peso. En el Anexo 1 se detalla la forma en que fueron calculados los porcentajes de pérdida de cada componente en base al incremento de cenizas y se compara con las pérdidas en base a peso.

Es importante señalar que las cenizas son el único componente en el sustrato cuya cantidad neta no varía debido al desarrollo vegetativo de las cepas. Las cenizas al ser metabolizados por el microorganismo son incorporadas eventualmente al micelio, pero en

ningún momento se presentan pérdidas o ganancias del sistema por lo que su cantidad permanece constante en el sustrato.

En las Tablas 3.34 y 3.35 se presentan la forma en que fueron consumidos los componentes del sustrato a los 25 y 50 días de incubación por las diferentes cepas. Los porcentajes de pérdida de cada componente en los dos tiempos de muestreo se evaluaron por medio de un análisis de varianza y la prueba de Duncan (Comparación múltiple de medias).

En relación a la degradación de la lignina, a los 25 días de incubación las cepas que consumieron la mayor cantidad fueron los controles (8 x 3 y 56 H1-N1 x Mo. 24), seguidas por las cepas 27 x 92 y 92 x 55. A los 50 días de incubación el mayor consumo correspondió a las cepas 86 x 92 y 56 H1-N1 x Mo. 24, seguido por las cepas 59 x 40 y 8 x 3. Estos resultados indican que al segundo tiempo, estos dos dicaríotes (C-) consumieron cantidades similares a las cepas testigo. Al comparar el consumo de lignina de cada cepa para los dos tiempos de muestreo, todas las cepas presentaron un mayor consumo de lignina al segundo tiempo de incubación (diferencias altamente significativas).

Con respecto al consumo de glucanos se observa que a los 25 días de incubación la cepa testigo 56 H1-N1 x Mo. 24 y la cepa 71 x 48 presentaron el mayor consumo de este componente (49%). En tanto que a los 50 días de incubación las cepas que presentan el mayor consumo de glucanos corresponden a la 8 x 3 y 56 H1-N1 x Mo. 24. Estos resultados demuestran que todos los dicaríotes (C-) presentan alteraciones en su metabolismo para consumir glucanos.

**TABLA 3.34: PERDIDA DE LIGNINA Y CARBOHIDRATOS DE LA PAJA DE TRIGO DESPUES DE 25 DIAS DE INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.**

C E P A S	P E R D I D A (%)		
	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
		GLUCANOS	XILANOS
<b>TESTIGOS</b>			
8 x 3	38.08 ± 0.73	35.19 ± 0.57	32.27 ± 0.49
56 H1-N1 x Mo. 24	38.56 ± 1.25	49.30 ± 1.09	37.29 ± 0.90
<b>DICARIOTES (C-)</b>			
16 x 65	ND	ND	ND
27 x 73	8.03 ± 1.14	21.41 ± 1.55	18.12 ± 1.13
27 x 92	27.05 ± 1.08	34.33 ± 1.38	37.18 ± 0.93
37 x 18	18.19 ± 0.79	12.80 ± 1.27	17.86 ± 1.18
59 x 40	24.91 ± 1.20	33.05 ± 0.69	25.63 ± 1.03
71 x 48	20.59 ± 1.78	47.25 ± 1.09	40.82 ± 0.77
74 x 92	16.83 ± 0.76	26.31 ± 1.43	21.12 ± 0.60
86 x 84	ND	ND	ND
86 x 92	ND	ND	ND
92 x 55	25.57 ± 1.46	35.88 ± 0.85	39.16 ± 1.22
92 x 73	ND	ND	ND

ND = No determinado

TABLA 3.35: PERDIDA DE LIGNINA Y CARBOHIDRATOS DE LA PAJA DE TRIGO DESPUES DE 50 DIAS DE INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.

C E P A S	P E R D I D A (%)		
	LIGNINA	CARBOHIDRATOS	
		GLUCANOS	XILANOS
<b>TESTIGOS</b>			
B x 3	44.66 ± 1.05	44.52 ± 2.52	55.75 ± 1.42
56 H1-N1 x Mo. 24	48.58 ± 1.61	41.78 ± 1.09	57.70 ± 1.29
<b>DICARIOTES (C-)</b>			
16 x 65	28.27 ± 0.41	21.89 ± 1.88	8.78 ± 1.55
27 x 73	20.92 ± 0.31	35.16 ± 1.52	52.21 ± 0.95
27 x 92	33.61 ± 0.49	34.54 ± 1.61	53.22 ± 0.66
37 x 18	31.49 ± 2.94	16.33 ± 0.66	51.97 ± 0.91
59 x 40	46.81 ± 0.95	29.90 ± 0.77	52.98 ± 0.93
71 x 48	36.34 ± 0.97	32.72 ± 2.00	61.49 ± 0.56
74 x 92	34.01 ± 3.45	28.62 ± 0.63	59.54 ± 0.21
86 x 84	6.09 ± 1.06	21.86 ± 1.41	39.40 ± 1.71
86 x 92	49.34 ± 0.83	37.66 ± 0.84	56.85 ± 0.87
92 x 55	34.41 ± 1.40	28.39 ± 2.27	52.77 ± 0.48
92 x 73	14.27 ± 1.32	11.07 ± 0.19	48.53 ± 1.05

Al considerar los dicaríotes 86 x 92 y 59 x 40 que fueron los que presentaron un mayor consumo de lignina, el primero consume un 37% de glucanos y el segundo un 30%. Estos resultados permiten visualizar que la capacidad para consumir lignina en estos dos dicaríotes no fue alterada pero fue posible disminuir el consumo de glucanos con respecto a las cepas testigo. Al comparar el consumo de glucanos a los 25 y 50 días para cada cepa, se observó con 4 cepas que el consumo aumentó con el tiempo de incubación. Con otras 4 cepas se presentó un eventual incremento en la cantidad de glucanos presente en el sustrato y con la cepa 27 x 92 el consumo fue de 34% para ambos tiempos.

Para el consumo de xilanos se observa que la cepa 86 x 92 consumió una cantidad semejante a la cepa 56 H1-N1 x Mo.24 (56%) y la cepa 59 x 40 consumió menor cantidad (53%). Conforme aumentó el tiempo de incubación se observó que todas las cepas consumieron mayor cantidad de xilanos.

Finalmente se comparó el consumo de carbohidratos con respecto al consumo de lignina. Esto se realizó para seleccionar aquellas cepas capaces de consumir menor cantidad de glucanos por gramo de lignina consumida.

En la Tabla 3.36 se presenta la cantidad residual de glucanos y xilanos por gramo de lignina. Con la prueba de Duncan se determinó que a los 50 días las cepas que presentaron un menor consumo de glucanos por gramo de lignina consumido corresponden a la 59 x 40 seguida por las cepas 86 x 92 y 37 x 18. Las cepas testigos 56 H1-N1 x Mo.24 y 8 x 3 ocuparon el cuarto y décimo

**TABLA 3.36: CAMBIO EN LA PROPORCION DE CELULOSA Y HEMICELULOSA CON RESPECTO A LIGNINA, EN LA PAJA DE TRIGO DESPUES DE 25 Y 50 DIAS DE INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS.**

C E P A S	CANTIDAD RELATIVA DE CARBOHIDRATOS (g de carbohidrato/g de lignina)			
	GLUCANOS		XILANOS	
	25 DIAS	50 DIAS	25 DIAS	50 DIAS
	-----			
<b>TESTIGOS</b>				
-----				
Paja (tiempo 0)	2.46 ± 0.07		1.31 ± 0.03	
-----				
8 x 3	2.58 ± 0.02	2.47 ± 0.11	1.44 ± 0.01	1.05 ± 0.03
56 H1-N1 x Mo 24	2.03 ± 0.05	2.79 ± 0.05	1.34 ± 0.02	1.08 ± 0.03
-----				
<b>DICARIOTES (C-)</b>				
-----				
16 x 65	ND	2.68 ± 0.06	ND	0.94 ± 0.03
27 x 73	2.09 ± 0.04	2.02 ± 0.05	1.16 ± 0.01	0.79 ± 0.01
27 x 92	2.22 ± 0.05	2.43 ± 0.06	1.13 ± 0.01	0.92 ± 0.02
37 x 18	2.55 ± 0.04	2.92 ± 0.06	1.28 ± 0.01	0.88 ± 0.02
59 x 40	2.14 ± 0.06	3.22 ± 0.03	1.28 ± 0.02	1.15 ± 0.03
71 x 48	1.67 ± 0.03	2.61 ± 0.08	1.00 ± 0.01	0.79 ± 0.01
74 x 92	2.18 ± 0.04	2.63 ± 0.02	1.24 ± 0.01	0.79 ± 0.01
86 x 84	ND	2.05 ± 0.03	ND	0.85 ± 0.02
86 x 92	ND	3.02 ± 0.04	ND	1.12 ± 0.02
92 x 55	2.18 ± 0.02	2.66 ± 0.11	1.10 ± 0.02	0.94 ± 0.01
92 x 73	ND	2.57 ± 0.05	ND	0.79 ± 0.01

ND = No determinado

lugar respectivamente. Este tipo de comparación permite concluir que los procesos de mutación y mejoramiento genético lograron alterar la capacidad de los dicaríotes (C-) para permitir una degradación selectiva de la paja de trigo lo cual puede ser aplicado a otros sustratos de tipo lignocelulósicos.

Para los xilanos las cepas que consumieron menor cantidad corresponden a la 59 x 40 seguida de la 86 x 92.

Con respecto al tiempo en que son consumidos los carbohidratos se observa que los xilanos se consume en mayor proporción durante los primeros 25 días. En tanto que los glucanos se consume en mayor proporción a partir de los 25 días de incubación (Anexo 2: Pérdida de celulosa y hemicelulosa en base a lignina).

#### IV DISCUSION

En el presente trabajo se aislaron y estudiaron varias mutantes acelulolíticas de *P. ostreatus*, elucidandose algunos aspectos básicos de la genética del carácter (C-) y lograndose al mismo tiempo obtener algunas cepas capaces de consumir de manera selectiva a la lignocelulosa. Las diferentes etapas que se pueden distinguir en el desarrollo del proyecto fueron: 1) Producción de mutantes (C-) a partir de micelio fragmentado y basidiosporas; 2) Optimización de los medios utilizados para caracterizar a las cepas; 3) Determinación del número de genes involucrados en el carácter (C-); 4) Hibridización de la primera progenie de la mutante (C-) y 5) Determinación de los patrones de consumo de los dicariotes (C-).

En los experimentos para producir y caracterizar a las mutantes acelulolíticas se observaron algunas diferencias en las condiciones experimentales dependiendo de la naturaleza del material mutado. Así para producir mutantes (C-) a partir de micelio monocariótico fragmentado se requiere que la cantidad de fragmentos de la suspensión inicial sea 10 veces más concentrada que la suspensión de basidiosporas. Este requerimiento se debe a que la cantidad de fragmentos viables en la suspensión de micelio fragmentado es 10 veces menor al número de esporas viables. La menor viabilidad de la suspensión de micelio fragmentado probablemente se deba a que el proceso de fragmentación rompe una gran cantidad de celulas, las cuales al ser cuantificadas microscópicamente no pueden ser diferenciadas entre viables y no

viables. Es decir, el número de unidades viables es igual para ambos casos.

Con respecto al proceso de mutación como tal, se observó que la cantidad de sobrevivientes y el tiempo de mutación no varían con la naturaleza del material biológico. Sin embargo, para detener la acción del mutágeno al usar micelio monocariótico se requiere que la suspensión miceliar después del tratamiento mutagénico sea diluida en una proporción de 1:10. De lo contrario se eliminan todas las posibilidades de recuperar sobrevivientes mutados. Las basidiosporas presentan una mayor resistencia a la acción del mutágeno ya que, requieren sólo una dilución de 1:4 para detener la acción del mutágeno. Esta es, posiblemente propiciada por la pared celular que recubre a las esporas y que en el caso del micelio fragmentado ésta no existe.

En la recuperación e identificación de las posibles mutantes se observó que las esporas necesitan un cierto tiempo para germinar. Por ello el medio de identificación se adiciona hasta que las esporas han germinado. Esto se debe a que las esporas son un material biológico que se encuentra con vida latente y su germinación se lleva a cabo cuando se presentan las condiciones favorables. En este caso las esporas son suspendidas en agua estéril y sometidas a la acción del mutágeno durante 60 minutos. Estas adversas condiciones del proceso de mutación ocasionan que las esporas necesiten de mayor tiempo para germinar, ya que primero se deben de recuperar de la acción del mutágeno.

Al observar la probabilidad que existe para obtener mutantes (C-) a partir de micelio fragmentado y de basidiosporas se encontró que únicamente para el micelio monocariótico fue posible obtener mutantes (C-). Así, para micelio monocariótico se recuperaron en 17 experimentos de mutación un total 235,125 colonias, de las cuales se identificó 1 sola mutante como acelulolítica total y 3 cepas más con carácter acelulolítico parcial. Ello implica, que la probabilidad de obtener mutantes (C-) total a partir de micelio fragmentado es de  $1 \times 10^6$ , o expresado de otra forma de 0.0001%. Para las basidiosporas no se obtuvo ninguna mutante pero únicamente se recuperaron 36,500 colonias. Probablemente el número de experimentos de mutación con basidiosporas fue insuficiente para obtener mutantes (C-). Sin embargo, la justificación de realizar un mayor número de experimentos con micelio fragmentado se fundamenta en la facilidad para obtener el material y el tiempo tan reducido para su obtención.

Considerando que la probabilidad para obtener mutantes acelulolíticas fue muy baja para las condiciones manejadas en el presente trabajo, sería recomendable que el tiempo de mutación se redujera a 40 minutos. Bajo estas condiciones es posible que se aumentara la probabilidad para obtener mutantes (C-) y al mismo tiempo se evitaría que las mutantes obtenidas presentaran alteraciones múltiples.

De los 2 métodos utilizados para evaluar el carácter (C-), el medio de papel filtro y el medio de CMC-DPMA, se determinó el segundo como el más adecuado. Dicho medio caracterizó a las

mutantes en forma más rigurosa, es decir permitió discriminar entre las de tipo acelulolítico total y parcial. El medio de papel filtro indentificó a todas las cepas que presentaron alguna deficiencia para consumir celulosa como acelulolíticas. Con base en lo anterior se sugiere utilizar los dos medio en forma complementaria. Es decir la prueba de papel filtro de manera preliminar para descartar el mayor número posible de cepas celulolíticas, cuando la magnitud de la población es muy grande. A continuación se debiera evaluar nuevamente el carácter (C-) en el medio de CMC - DPMA. Con este criterio se evaluó el carácter (C-) de la progenie obtenida durante el mejoramiento genético. Los resultados obtenidos indicaron que existían 8 cepas en cada población con carácter (C-).

Para probar el carácter acelulolítico de los dicaríotes progenie se utilizaron simultáneamente ambos medios. Los resultados indicaron en este caso, que las dos pruebas fueron complementarias y necesarias ya que con cada medio por separado se presentó la posibilidad de evaluar erróneamente el carácter de una cepa. Por ello sería indispensable optimizar en un futuro los métodos de evaluación del carácter (C-) para que cada uno proporcione resultados independientes y se puedan utilizar como métodos alternos de evaluación.

Para determinar el número de genes que deben estar alterados para obtener cepas acelulolíticas fue necesario evaluar con la mayor precisión posible este carácter en la progenie de la mutante 56 H1-N1. Por ello la capacidad o incapacidad para

consumir celulosa de cada cepa progenie se probó primero en el medio de papel filtro y las cepas de tipo (C-) se probaron nuevamente en el medio de CMC. De esta forma se consideraron como cepas con carácter acelulolítico aquellas que no consumieron la celulosa en ninguno de los dos medios. Como ya se había indicado 8 cepas de cada población presentaron carácter acelulolítico. En la primera población la prueba de  $X^2$  indicó que era factible que estuvieran involucrados 4 o 5 genes en el carácter (C-). Los resultados de la segunda población sólo indicaron que existen 5 genes involucrados en dicho carácter. Estos últimos resultados se consideran más confiables debido al mayor tamaño de esta población. La presencia de los 5 genes fue corroborada al considerar las dos poblaciones como una sólo de mayor magnitud. Considerando lo anterior se sugiere que cuando el número de genes involucrados en una característica determinada es mayor de 3 el tamaño de la población recuperada debe ser mayor de 300 cepas. Ello se fundamenta en los datos de la Tabla 19 (Experimentos y Resultados) en donde se determinó por ejemplo que cuando existen más de 4 genes involucrados en un carácter determinado únicamente se obtendrá el 6% de la población con dicha característica. Por ello para obtener un mayor número de cepas con una característica determinada se requiere incrementar de manera proporcional el tamaño de la población recuperada. Otra de las razones por las cuales el tamaño de la población debe ser incrementada es cuando se desean obtener cepas (C-) de los 4 tipos de compatibilidad. Como en este caso, en donde uno de los objetivos del mejoramiento genético era obtener dicariotes (C-). Por ello se requería que dentro de la progenie acelulolítica se obtuvieran cepas de los

cuatro tipos de compatibilidad para hibridizarlas y obtener dicariotes. Por esta razón era indispensable que el tamaño de la población bajo estas condiciones pueda asegurar la obtención de cepas (C-) y de los 4 tipos de compatibilidad.

Al hibridizar monocariotes con diferentes capacidades para consumir celulosa se observó que la probabilidad de obtener dicariotes (C-) varia de acuerdo al carácter de los monocariotes apareados. Así cuando los dos monocariotes hibridizados son de tipo (C-) el 100% de los dicariotes resultantes fueron de tipo (C-). Ello indica que probablemente en este caso los dos monocariotes presentan alteraciones en los 5 genes necesarios para que el carácter (C-) se exprese. Cuando estos se aparean sólo resultan dicariotes incapaces de consumir celulosa. Sin embargo, cuando 1 o los 2 monocariotes hibridizados son de tipo celulolítico, la probabilidad de obtener dicariotes (C-) disminuye a un 7% aproximadamente. Este resultado aparentemente contradictorio puede explicarse en términos de que las cepas (C+) capaces de producir dicariotes (C-) contienen en su genoma algunos de los genes que determinan el carácter (C-). Así, al hibridizarse es posible que se reúnan todos los genes necesarios para que se exprese el carácter (C-). También existe la posibilidad de que los genes mutados no se encuentren por duplicado, es decir en los genomas de los 2 monocariotes, lo que sugiere que alguno de ellos es de carácter dominante.

Después de hibridizar los monocariotes y caracterizar los dicariotes resultantes se obtuvieron 24 dicariotes con carácter

(C-). Dado que el número de cepas era muy elevado como para evaluar su capacidad para consumir los componentes de la lignocelulosa se realizó una prueba preliminar para llevar a cabo una selección. Por ello se evaluó el desarrollo miceliar de cada cepa en un sustrato lignocelulósico y simultáneamente en un medio simple de peptona. El desarrollo miceliar presentado en el medio de paja permitió clasificar a los 24 dicariotes (C-). Así se obtuvieron 4 cepas con pobre desarrollo miceliar; 14 con buen desarrollo y 6 con abundante desarrollo. Además al comparar el desarrollo en el medio de paja con respecto al de peptona en cada grupo se encontraron cepas con menor, igual y mayor desarrollo miceliar. Con base en el heterogéneo desarrollo miceliar de los 24 dicariotes acelulolíticos se consideró pertinente evaluar únicamente los patrones de consumo de 11 diferentes cepas correspondientes a cada uno de los diferentes comportamientos en crecimiento. Así 3 de las cepas seleccionadas presentaron pobre desarrollo miceliar en paja; 4 presentaron un buen desarrollo y 4 abundante desarrollo.

Una vez seleccionados los dicariotes (C-) y 2 cepas testigo; todas las cepas se inocularon en paja de trigo para permitir su desarrollo miceliar durante 25 y 50 días. El material resultante se analizó para determinar la forma en que son consumidos los componentes de la lignocelulosa.

Al comparar el consumo de celulosa a los 50 días de incubación de las 2 cepas testigo se observó que fue menor para la cepa S6 H1-N1 x Mo. 24. Este resultado indica que posiblemente la mutante acelulolítica influyó para que el consumo de celulosa

fuera menor. Cuando se comparó el consumo de celulosa de todos los dicariotes (C-) con respecto a las cepas testigo se encontró, que todos los dicariotes (C-) consumieron menor cantidad. Las cepas testigo consumieron de 42 a 44% en tanto que los dicariotes (C-) consumieron de 11 a 37%. Si se comparan estos resultados con el comportamiento de una cepa acelulolítica de *S. pulverulentum* obtenida por Eriksson (1978), se sabe que en esta última cepa el consumo de celulosa esta totalmente bloqueada, mientras que nuestros 11 dicariotes acelulolíticos tienen parcialmente bloqueada su capacidad para consumir celulosa. Una posible explicación de ello es que la cepa (C-) de Eriksson es una mutante y nuestras cepas (C-) fueron obtenidas de la progenie de un dicariote formado por una mutante (C-) y un monocariote silvestre. Ello posiblemente ocasionó que la incapacidad para consumir celulosa de la mutante se modificara durante el mejoramiento genético. Sin embargo, el mejoramiento genético fue indispensable ya que, la mutante S6 H1-N1 presentó características de desarrollo muy lentas en los sustratos lignocelulósicos. Ello hacia imposible su desarrollo en un sustrato pasteurizado, debido al elevado nivel de contaminaciones que se presentaban y seria incosteable para un proceso práctico llevar a cabo su desarrollo en condiciones de esterilidad.

Otra de las causas de la detección de un consumo parcial de celulosa por dicariotes (C-) puede ser el resultado de una deficiencia en los métodos de evaluación del carácter (C-). Con ya se habia indicado los medios de caracterización presentaron dificultades para evaluar el carácter (C-) de manera

independiente. Por ello se hace patente que la selectividad de los medios de caracterización debe ser incrementada en un futuro para detectar cepas totalmente acelulolíticas.

Por otro lado con respecto al consumo de lignina 9 de los dicaríotes (C-) consumieron menor cantidad de lignina que las cepas testigo. Los dicaríotes 59 x 40 y 86 x 92 consumieron cantidades semejantes a las cepas testigo 56 H1-N1 x Mo. 24 y 8 x 3. Ello sugiere que en dichos dicaríotes (C-) la capacidad para consumir lignina no fue alterada durante el proceso de mutación. Al comparar el consumo de lignina de los dicaríotes 59 x 40 y 86 x 92 con el de la mutante (C-) de Eriksson se observó que nuestras cepas consumen mayor cantidad de lignina en menor tiempo. Es decir los dicaríotes 59 x 40 y 86 x 92 consumieron de 46 a 49% de lignina después de 50 días de incubación, en tanto que la mutante 44 de Eriksson consumió únicamente 32% de lignina después de 70 días.

Con respecto a la evolución que presenta el consumo de los componentes de la lignocelulosa a los 25 y 50 días de incubación se observó que tanto el consumo de lignina, como el de hemicelulosa se incrementaron de los 25 a los 50 días de incubación. Sin embargo, tal incremento en el consumo de celulosa no se observó con las 9 cepas evaluadas. De estas únicamente con 4 se incremento el consumo, con 1 cepa no varió el consumo y con las 4 restantes se presentó una disminución en el consumo. Cabe señalar que el desarrollo miceliar de estas últimas cepas en el sustrato fue bueno o abundante. Esto sugiere que el sustrato al

segundo tiempo de incubación había sido invadido fuertemente por el desarrollo miceliar de las cepas, lo cual probablemente ocasionó que la cantidad de glucanos en el sustrato aumentara. Dicho aumento se debe a que la pared celular del hongo está constituida principalmente por glucanos y por ello se detecta un incremento en la cantidad de celulosa del sustrato que es proporcional al desarrollo miceliar. En realidad esto sólo refleja un buen desarrollo de las cepas en el sustrato.

Con respecto al periodo en el cual son consumidos los carbohidratos de la lignocelulosa se detectó, que la celulosa en general es consumida en mayor cantidad a los 50 días de incubación. Sin embargo, la hemicelulosa se consume en mayor cantidad durante los primeros 25 días de incubación (Tablas A.2.4 y A.2.5 del Anexo II).

Finalmente resulta interesante comparar el consumo de los componentes de la lignocelulosa por las 11 cepas (C-) con respecto al crecimiento miceliar en los medios de paja y de peptona. Esta comparación posiblemente permita determinar si existe una relación que sirva como parámetro para seleccionar las cepas con mayor consumo de lignina y menor de celulosa.

Como se puede observar en la Tabla 4.1 las cepas que presentaron un crecimiento pobre en paja se caracterizaron por consumir menor cantidad de celulosa. Sin embargo, las cepas con crecimiento bueno o abundante en paja consumieron de manera semejante todos los componentes de la lignocelulosa, pero en comparación con las cepas de crecimiento pobre consumen mayor

**TABLA 4.1: CONSUMO DE LOS COMPONENTES DE LA LIGNOCELULOSA POR LOS DICARIOTES ACELULOLITICOS EN FUNCION DE SU CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE PAJA.**

CRECIMIENTO EN PAJA	C O N S U M O (%)		
	LIGNINA	GLUCANOS	XILANOS
POBRE	26.33 ± 10.78	18.33 ± 8.73	53.00 ± 5.56
BUENO	36.75 ± 8.84	30.00 ± 6.48	54.75 ± 5.31
ABUNDANTE	39.00 ± 15.25	30.00 ± 6.37	49.50 ± 6.35

cantidad de lignina. Dentro del grupo de cepas con bueno o abundante desarrollo en el medio de paja se encontraron las cepas que consumieron menor cantidad de celulosa por gramo de lignina consumida.

En la Tabla 4.2 se relacionó el consumo de los componentes de la lignocelulosa por los 11 dicaríotes (C-) con respecto al crecimiento presentado entre el medio de paja y el medio de peptona. Cuando el crecimiento fue menor en el medio de paja las cepas consumen mayor cantidad de lignina y celulosa. Para un igual crecimiento en ambos medios el consumo de lignina y celulosa son menores que los anteriores. Finalmente cuando el crecimiento es mayor en paja el consumo de lignina y celulosa es semejante al grupo de menor crecimiento en paja. Resumiendo lo anterior la selección de los dicaríotes (C-) para evaluar la forma en que es consumida la lignocelulosa se debería llevar a cabo tomando las cepas con bueno y abundante desarrollo en paja. Al mismo tiempo se deben de considerar aquellas que presentaron menor o mayor desarrollo en el medio de paja que en peptona. Con este criterio hubiera sido únicamente necesario evaluar los patrones de consumo de 7 dicaríotes (C-) en vez de las 11 cepas evaluadas. Por lo tanto, el uso de este criterio para experimentos futuros puede reducir sensiblemente la carga de trabajo implicada por el análisis químico de los sustratos.

**TABLA 4.2: CONSUMO DE LOS COMPONENTES DE LA LIGNOCELULOSA POR LOS DICARIOTES ACELULOLITICOS EN FUNCION DEL CRECIMIENTO OBSERVADO EN EL MEDIO DE PAJA CON RESPECTO AL DE PEPTONA.**

CRECIMIENTO EN PAJA/PEPTONA	C O N S U M O (%)		
	LIGNINA	GLUCANOS	XILANOS
MENOR	38.5 ± 14.84	29.5 ± 10.60	53.0 ± 5.60
IGUAL	26.0 ± 13.39	24.7 ± 7.89	49.2 ± 6.18
MAYOR	30.2 ± 12.69	27.4 ± 9.55	54.6 ± 5.31

## V CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con los experimentos de mutación sugieren que la probabilidad de obtener mutantes (C-) a partir de micelio monocariótico fue muy baja ( $1 \times 10^6$ ). Para las basidiosporas no fue posible determinar dicha probabilidad, debido a que el número de experimentos de mutación que se realizó fue insuficiente. Por otro lado en los experimentos de mutación con micelio monocariótico fue posible obtener 3 mutantes con carácter acelulolítico parcial, las cuales podrían ser de utilidad en estudios posteriores.

Bajo las condiciones estudiadas se encontró que los 2 medios para evaluar el carácter acelulolítico fueron utilizados de manera complementaria. Por ello se concluye que estos deberán de optimizarse para ser empleados en un futuro como métodos alternativos de evaluación.

Con el mejoramiento genético se elucidaron algunos aspectos básicos relacionados con la genética del carácter (C-). La mutante acelulolítica S6 HI-N1, fue hibridizada con un monocariote silvestre para estudiar en su descendencia la segregación del carácter acelulolítico. Así, se determinó que son 5 genes los que deben ser alterados para que el carácter acelulolítico se exprese. Este resultado indica que la probabilidad para obtener cepas (C-) en un primer paso de mejoramiento genético, es decir en la primera progenie, es muy baja (3.3%). No obstante, esta es todavía muy superior a la probabilidad de obtener cepas (C-) por mutaciones, la cual fue de  $1 \times 10^6$ .

Como resultado de la hibridación de la progenie del dicariote 56 H1-N1 x Mo.24 con diferente capacidad para consumir celulosa se determinó que la probabilidad que existe para obtener dicariotes (C-) depende del carácter de los monocariotes hibridizados. Así cuando se aparearon monocariotes acelulolíticos se tuvo una probabilidad del 100% de obtener dicariotes (C-). Sin embargo, cuando uno o los dos monocariotes fueron de tipo (C+) esta probabilidad disminuye a 7% aproximadamente.

Con el trabajo de mejoramiento genético realizado se obtuvieron 24 cepas dicarióticas con carácter (C-) y con distinto grado de vigor. De estas cepas 11 dicariotes acelulolíticos fueron seleccionados para propagarse en un sustrato lignocelulósico y evaluar sus patrones de consumo.

Los resultados obtenidos indican que la capacidad para consumir lignina de la mayoría de los dicariotes (C-) fue menor que las cepas testigo. Sin embargo, 2 de los dicariotes presentaron un consumo semejante a las cepas testigo (59 x 40 y 86 x 92). Este tipo de resultados eran de esperarse debido a que la selección de cepas después del tratamiento de mutación y el mejoramiento genético se realizó considerando únicamente una disminución de la capacidad para consumir celulosa y sin considerar el consumo de lignina.

Al analizar la capacidad de los dicariotes (C-) para consumir celulosa, se observó una disminución en todos los casos como era de esperarse. Sin embargo, no fue posible obtener cepas

totalmente acelulolíticas. Por ello se concluye que los métodos para la selección del carácter (C-) que a futuro se utilicen deberán de ser más selectivos o posiblemente de tipo cuantitativo y no cualitativo.

Con respecto al consumo de celulosa de las 11 cepas probadas se observó para el caso concreto de las cepas 56 H1-N1 x Mo. 24, 59 x 40, 71 x 48 y 92 x 55 que la cantidad de celulosa en vez de disminuir aumentó al segundo tiempo de incubación. Este tipo de comportamiento se puede explicar debido a que al desarrollarse el micelio vegetativo se eleva la cantidad de glucanos en el medio por la formación de pared celular.

No obstante las consideraciones anteriores fue posible obtener una cepa capaz de consumir un 46% de lignina y tan sólo un 30% de celulosa, en comparación con una de las cepas testigo que consume 44% de lignina y 44% de celulosa. La cual se ha visto que se comporta de manera semejante bajo las mismas condiciones.

## SUGERENCIAS

Con el trabajo realizado a la fecha se han sentado las bases para realizar la última fase de este proyecto, lo cual nos permitira arribar a un proceso de tipo práctico. Por ello es necesario iniciar pruebas con las cepas acelulolíticas disponibles para determinar los cambios en la digestibilidad in vitro y posteriormente in vivo de diferentes materiales lignocelulósicos. Simultáneamente debe continuarse con el estudio y mejoramiento genético de las cepas (C-) con el objeto de obtener cepas con un menor consumo de celulosa y que presenten mayor vigor.

## VI ANEXO I

CALCULOS PARA OBTENER LA COMPOSICION DEL SUSTRATO EXPRESADA EN BASE CONSTANTE (CENIZAS), LOS PORCENTAJES DE DEGRADACION DE CADA COMPONENTE Y LA CANTIDAD RELATIVA DE CARBOHIDRATOS EN BASE A LIGNINA.

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

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

La composición en base a cenizas para cada cepa se calculó dividiendo los 6 valores de cada componente entre el valor promedio de sus cenizas. De esta forma es posible determinar las variaciones en el consumo de cada componentes a los diferentes tiempos de incubación.

Así, por ejemplo para calcular la composición en base a cenizas de la paja sin inocular, cada uno de los datos de composición se dividió entre su valor promedio de cenizas (Tabla A.1.1).

## VI ANEXO I

CALCULOS PARA OBTENER LA COMPOSICION DEL SUSTRATO EXPRESADA EN BASE CONSTANTE (CENIZAS), LOS PORCENTAJES DE DEGRADACION DE CADA COMPONENTE Y LA CANTIDAD RELATIVA DE CARBOHIDRATOS EN BASE A LIGNINA.

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

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

La composición en base a cenizas para cada cepa se calculó dividiendo los 6 valores de cada componente entre el valor promedio de sus cenizas. De esta forma es posible determinar las variaciones en el consumo de cada componentes a los diferentes tiempos de incubación.

Así, por ejemplo para calcular la composición en base a cenizas de la paja sin inocular, cada uno de los datos de composición se dividió entre su valor promedio de cenizas (Tabla A.1.1).

**TABLA A.1.1 COMPOSICION EN BASE CENIZAS DE LA PAJA DE TRIGO SIN INOCULAR.**

COMPOSICION DE LA PAJA DE TRIGO SIN INOCULAR				
REPLICAS	COMPONENTES			
	CENIZAS	LIGNINA	GLUCANOS	XILANOS
1	4.41	19.85	50.18	26.66
2	4.00	20.13	51.81	26.30
3	4.23	20.71	48.54	26.30
4	4.03	20.57	51.00	26.30
5	4.60	20.59	51.00	27.39
6	4.12	20.21	48.54	27.39
COMPOSICION EN BASE A CENIZAS				
	$\bar{x} = 4.23$	4.69	11.86	6.30
		4.76	12.25	6.22
		4.89	11.47	6.22
		4.86	12.06	6.22
		4.87	12.06	6.48
		4.78	11.48	6.48
		<u>4.81 ± 0.07</u>	<u>11.86 ± 0.32</u>	<u>6.32 ± 0.13</u>

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

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

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

En donde:

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

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

Con el propósito de conocer las variaciones en cada cepa debido a las repeticiones se aplicó la fórmula anterior para cada uno de los 6 valores de cada componente con respecto al valor promedio de cada componente de la paja de trigo sin inocular.

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

Datos:

$$\frac{\text{g componente}}{\text{g lignina (t=0)}} = 4.81$$

<u>g componente</u> g lignina (t=25 días)	Pérdida de lignina (%)
2.98	4.81 - 2.98/4.81 = 38.04
2.98	4.81 - 2.98/4.81 = 38.04
2.95	4.81 - 2.95/4.81 = 38.67
3.03	4.81 - 3.03/4.81 = 37.00
2.93	4.81 - 2.93/4.81 = 39.08
3.00	4.81 - 3.00/4.81 = 37.63

% Pérdida de lignina = 38.08 ± 0.73

En la Tabla A.1.2 se presenta una comparación de las pérdidas en peso calculadas por el incremento de cenizas con respecto a las pérdidas obtenidas por la disminución en peso debida al consumo de los componentes del sustrato por las diferentes cepas. Como se puede observar, no existen diferencias significativas entre ambos valores. Por ello es factible concluir que los resultados de degradación calculados con base en el incremento de cenizas también representan la forma en que fueron consumidos cada uno de los componentes de la paja por las diferentes cepas.

### 3.- CALCULO DE LA PROPORCION RELATIVA DE CELULOSA Y HEMICELULOSA EN BASE A LIGNINA.

Este tipo de cálculos se realizaron para seleccionar las cepas que presentaran un menor consumo de carbohidratos por cada gramo de lignina consumida. Además es posible visualizar el tiempo en que son consumidos en mayor proporción cada tipo de carbohidrato. Así por ejemplo los cálculos de consumo de celulosa en base a lignina se realizaron por medio de la siguiente

**TABLA A.1.2 PERDIDA EN PESO DE LA PAJA DE TRIGO DESPUES DE 25 DIAS INCUBACION CON DICARIOTES ACELULOLITICOS CONSIDERANDO EL INCREMENTO DE CENIZAS Y EL PESO PERDIDO POR EL CONSUMO DE SUS COMPONENTES.**

CEPAS	PERDIDA EN PESO (%)	
	INCREMENTO DE CENIZAS	PESO PERDIDO
8 x 3	31.44 ± 1.12	31.35 ± 3.18
56 H1N1 x Mo.24	33.80 ± 1.31	33.57 ± 4.72
16 x 65	ND	ND
27 x 73	15.73 ± 0.38	15.79 ± 0.41
27 x 92	31.55 ± 0.96	31.61 ± 1.22
37 x 18	15.06 ± 1.14	14.93 ± 0.86
59 x 40	22.24 ± 1.18	21.94 ± 0.87
71 x 48	33.70 ± 0.78	33.66 ± 0.21
74 x 92	15.74 ± 0.32	15.73 ± 0.17
86 x 84	ND	ND
86 x 92	ND	ND
92 x 55	30.77 ± 1.43	31.11 ± 0.59
92 x 73	ND	ND

fórmula:

$$\text{Celulosa en base lignina} = \frac{\frac{\text{g celulosa}}{\text{g cenizas (t=t)}}}{\frac{\text{g lignina}}{\text{g cenizas (t=t)}}}$$

En donde:

g celulosa = Cantidad de celulosa en base a cenizas a los  
g cenizas (t=t) 25 o 50 días de incubación.

g lignina = Cantidad promedio de la lignina en base a  
g cenizas (t=t) cenizas a los 25 o 50 días de incubación.

De esta forma es posible determinar las variaciones que existen entre las replicas debido al consumo de carbohidratos con respecto a la lignina. Así para calcular la celulosa en base a lignina de la cepa 8 x 3 a los 25 días de incubación se procedió de la siguiente manera:

Datos:

Lignina en base a cenizas = 2.98

Celulosa en base a cenizas	Calculos de celulosa en base a lignina
7.60	7.60/2.98 = 2.55
7.73	7.73/2.98 = 2.59
7.60	7.60/2.98 = 2.55
7.73	7.73/2.98 = 2.59
7.73	7.73/2.98 = 2.59
7.73	7.73/2.98 = 2.59

Celulosa en base lignina de la cepa 8 x 3 a los 25 días de incubación = 2.58 ± 0.02.

## ANEXO II

Para comparar el consumo de los componentes de la paja de trigo por los 11 dicarlotos (C-) y las cepas controles, se realizó un análisis de varianza para cada componente. En todos los análisis de varianza se encontraron diferencias altamente significativas ( $P=99\%$ ). Por ello que se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias (Duncan). Los resultados de esta prueba permitirán seleccionar a las cepas con un consumo mayor de lignina y menor de celulosa. Además se comparó para cada cepa la pérdida de capa componente a los 25 y 50 días de incubación por medio de una prueba "T".

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del paquete estadístico S.P.S.S. (Statistical Package for the Social Sciences) en la computadora Burroughs 7800.

A continuación se presentan los resultados del análisis estadístico que se llevó a cabo para determinar el consumo de cada componente por las diferentes cepas así como, para el consumo de los carbohidratos celulosa y hemicelulosa con respecto a la lignina.

**TABLA A.2.1. ANALISIS ESTADISTICO PARA EL CONSUMO DE LIGNINA DE LOS 11 DICARIOTES ACELULOLITICOS Y LAS DOS CEPAS CONTROL.**

PRUEBAS ESTADISTICAS		RESULTADOS
ANALISIS DE VARIANZA		DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACION.
PRUEBA DE DUNCAN	Tiempo 1	Tiempo 2
	27 X 73 a 37 x 18 b 74 x 92 b 71 x 48 c 59 x 40 c 92 x 55 d 27 x 92 d 8 x 3 e 56 H1N1 x Mo.24 e	86 x 84 a 92 x 73 b 27 x 73 c 16 x 65 d 37 x 18 d 74 x 92 e 27 x 92 e 92 x 55 ef 71 x 48 f 8 x 3 g 59 x 40 g 56 H1N1 x Mo.24 h 86 x 92 h
PRUEBA "T"	8 x 3 56 H1N1 x Mo.24 27 x 73 27 x 92 37 x 18 59 x 40 71 x 48 74 x 92 92 x 55	Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%) Mayor (P=99%)

**ANALISIS DE VARIANZA:** Este análisis indicó que existía una diferencia altamente significativa entre los sustratos debido al desarrollo miceliar de las diferentes cepas.

**PRUEBA DE DUNCAN:** Las letras diferentes para un mismo tiempo implican diferencias significativas entre las cepas (P=99%). Las cepas se ordenaron de menor a mayor pérdida considerando su media ( $\bar{x}$ ).

**PRUEBA "T":** Esta prueba se utilizó para comparar el aumento en la degradación de lignina entre los 25 y 50 días de incubación para cada cepa.

**TABLA A.2.2 ANALISIS ESTADISTICO PARA EL CONSUMO DE GLUCANOS DE LOS 11 DICARIOTES ACELULOLITICOS Y LAS DOS CEPAS CONTROL.**

PRUEBAS ESTADISTICAS		RESULTADOS	
ANALISIS DE VARIANZA		DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACION.	
PRUEBA DE DUNCAN	Tiempo 1	Tiempo 2	
	37 X 18	a	92 x 73
	27 x 73	b	37 x 18
	74 x 92	c	86 x 84
	27 x 92	d	16 x 65
	59 x 40	d	74 x 92
	8 x 3	de	92 x 55
	92 x 55	e	59 x 40
	71 x 48	f	71 x 48
	56 H1N1 x Mo.24	f	27 x 92
			27 x 73
			86 x 92
			56 H1N1 x Mo.24
			8 x 3
			h
PRUEBA "T"	8 x 3	Mayor (P=99%)	
	56 H1N1 x Mo.24	Menor (P=99%)	
	27 x 73	Mayor (P=99%)	
	27 x 92	Igual	
	37 x 18	Mayor (P=99%)	
	59 x 40	Menor (P=99%)	
	71 x 48	Menor (P=99%)	
	74 x 92	Mayor (P=99%)	
	92 x 55	Menor (P=99%)	

ANALISIS DE VARIANZA: Este análisis indicó que existía una diferencia altamente significativa entre los sustratos debido al desarrollo miceliar de las diferentes cepas.

PRUEBA DE DUNCAN: Las letras diferentes para un mismo tiempo implican diferencias significativas entre las cepas (P=99%). Las cepas se ordenaron de menor a mayor pérdida considerando su media ( $\bar{x}$ ).

PRUEBA "T": Esta prueba se utilizó para comparar la degradación de los glucanos entre los 25 y 50 días de incubación para cada cepa.

**TABLA A.2.3 ANALISIS ESTADISTICO PARA EL CONSUMO DE XILANOS DE LOS 11 DICARIOTES ACELULOLITICOS Y LAS DOS CEPAS CONTROL.**

PRUEBAS ESTADISTICAS		RESULTADOS	
ANALISIS DE VARIANZA		DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACION.	
PRUEBA DE DUNCAN	Tiempo 1	Tiempo 2	
	37 X 18	a	86 x 84 a
	27 x 73	a	92 x 73 b
	74 x 92	b	16 x 65 b
	59 x 40	c	37 x 18 c
	8 x 3	d	27 x 73 c
	27 x 92	e	92 x 55 c
56 H1N1 x Mo.24	e	59 x 40	c
	92 x 55	f	27 x 92 c
	71 x 48	f	8 x 3 d
			86 x 92 de
		56 H1N1 x Mo.24	e
		74 x 92	f
		71 x 48	g
PRUEBA "T"	8 x 3	Mayor (P=99%)	
	56 H1N1 x Mo.24	Mayor (P=99%)	
	27 x 73	Mayor (P=99%)	
	27 x 92	Mayor (P=99%)	
	37 x 18	Mayor (P=99%)	
	59 x 40	Mayor (P=99%)	
	71 x 48	Mayor (P=99%)	
	74 x 92	Mayor (P=99%)	
	92 x 55	Mayor (P=99%)	

**ANALISIS DE VARIANZA:** Este analisis indicó que existía una diferencia Altamente significativa entre los sustratos debido al desarrollo miceliar de las diferentes cepas.

**PRUEBA DE DUNCAN:** Las letras diferentes para un mismo tiempo implican diferencias significativas entre las cepas (P=99%). Las cepas se ordenaron de menor a mayor pérdida considerando su media ( $\bar{x}$ ).

**PRUEBA "T":** Esta prueba se utilizó para comparar el aumento en la degradación de xilanos entre los 25 y 50 días de incubación para cada cepa.

**TABLA A.2.4 ANALISIS ESTADISTICO PARA EL CONSUMO DE GLUCANOS EN BASE A LIGNINA DE LOS 11 DICARIOTES ACELULOLITICOS Y LAS DOS CEPAS CONTROL.**

PRUEBAS ESTADISTICAS		RESULTADOS	
ANALISIS DE VARIANZA		DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACION.	
PRUEBA DE DUNCAN	Tiempo 1	Tiempo 2	
	71 x 48 a	27 x 73 a	a
56 H1N1 x Mo.24	b	86 x 84 a	a
	27 x 73 c	27 x 92 b	b
	59 x 40 cd	Control (paja) b	b
	92 x 55 de	8 x 3 b	b
	74 x 92 ef	92 x 73 c	c
	27 x 92 f	71 x 48 c	c
Control (paja)	g	74 x 92 c	c
	37 x 18 h	92 x 55 c	c
	8 x 3 h	16 x 65 c	c
		56 H1N1 x Mo.24 d	d
		37 x 18 e	e
		86 x 92 f	f
		59 x 40 g	g
PRUEBA "T"	8 x 3	Menor (P=95%)	
	56 H1N1 x Mo.24	Mayor (P=99%)	
	27 x 73	Menor (P=95%)	
	27 x 92	Mayor (P=99%)	
	37 x 18	Mayor (P=99%)	
	59 x 40	Mayor (P=99%)	
	71 x 48	Mayor (P=99%)	
	74 x 92	Mayor (P=99%)	
	92 x 55	Mayor (P=99%)	

**ANALISIS DE VARIANZA:** Este análisis indicó que existía una diferencia altamente significativa entre los sustratos debido al desarrollo micelar de las diferentes cepas.

**PRUEBA DE DUNCAN:** Las letras diferentes para un mismo tiempo implican diferencias significativas entre las cepas (P=99%). Las cepas se ordenaron de menor a mayor pérdida considerando su media ( $\bar{x}$ ).

**PRUEBA "T":** Esta prueba se utilizó para determinar el tiempo en que son degradados los glucanos en base a lignina para cada cepa.

**TABLA A.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL CONSUMO DE XILANOS EN BASE A LIGNINA DE LOS 11 DICARIOTES ACELULOLITICOS Y LAS DOS CEPAS CONTROL.**

PRUEBAS ESTADÍSTICAS	RESULTADOS	
ANÁLISIS DE VARIANZA	DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P=99%) EN CADA TIEMPO DE INCUBACION.	
PRUEBA DE DUNCAN	Tiempo 1	Tiempo 2
	71 x 48 a	92 x 73 a
	92 x 55 b	74 x 92 a
	27 x 92 c	27 x 73 a
	27 x 73 d	71 x 48 a
	74 x 92 e	86 x 84 b
	37 x 18 ef	37 x 18 c
	59 x 40 f	16 x 65 d
	Control (paja) g	27 x 92 d
	8 x 3 h	92 x 55 d
		8 x 3 e
		56 H1N1 x Mo.24 f
		86 x 92 g
		59 x 40 h
		Control (paja) i
PRUEBA "T"	8 x 3	Menor (P=99%)
	56 H1N1 x Mo.24	Menor (P=99%)
	27 x 73	Menor (P=99%)
	27 x 92	Menor (P=99%)
	37 x 18	Menor (P=99%)
	59 x 40	Menor (P=99%)
	71 x 48	Menor (P=99%)
	74 x 92	Menor (P=99%)
	92 x 55	Menor (P=99%)

**ANÁLISIS DE VARIANZA:** Este análisis indicó que existía una diferencia altamente significativa entre los sustratos debido al desarrollo micelial de las diferentes cepas.

**PRUEBA DE DUNCAN:** Las letras diferentes para un mismo tiempo implican diferencias significativas entre las cepas (P=99%). Las cepas se ordenaron de menor a mayor pérdida considerando su media ( $\bar{x}$ ).

**PRUEBA "T":** Esta prueba se utilizó para determinar el tiempo en que son degradados los xilanos en base a lignina para cada cepa.

## VII BIBLIOGRAFIA

- Aguilera, A.; Hernández, M y Ramirez B. 1982. Delignificación de rastrojo de maiz por *Pleurotus ostreatus*. Tesis UNAM. Fac. de Química.
- Ander P. and K.E. Eriksson (1976a). The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol., 109:1-8.
- Ander P. and K.E. Eriksson (1976b). Degradation of lignin with wild type and mutant strains of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Material und Organism. Beiheft 3:129-140.
- Ander P. and K.E. Eriksson (1977). Selective Degradation of Wood Componentes by white-rot fungi. Physiol. Plant., 41, 239.
- Ander P. and K. E. Eriksson (1978). Lignin degradation and utilization by microorganisms. In: Progress in Industrial Microbiology. M. J. Bull (Ed.) Elsevier, Amsterdam, N.Y.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1960. Official Methods of Analysis. Ninth Edition.
- Avilés Esquivel M.E. (1987). Desarrollo de la metodología para la producción y recuperación de mutantes esclerolíticas de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de maestría en proceso de escritura.
- Bassham J.A. (1975). Cellulose as a chemical and energy source. In: Cellulose as a Chemical and Energy Source. Wilkie C.R. (Ed.). John Wiley.
- Block S., G. Tsao y L. Han (1958). Production of mushrooms from sawdust. J. Agric. & Food Chem., 6:923-27.
- Chang C. and R. Hayes (1978). The Biology and Cultivation of Edible Fungi. Academic Press New York.
- Cote W.A. (1977). Wood structure in relation to chemical composition. In: The Structure, Biosynthesis and Degradation of Wood. Loewus F.A. y V.C. Runeckles (Ed.) Recent Adv. Phytochem., Vol. II. Plenum Press, New York.
- Crawford R.L. (1981). Lignin Biodegradation and Transformation. John Wiley. New York.
- Delariaz, R. E. (1961) Routine Analysis of Carbohidrates and Lignin in Herbage. J. Sci. Food Agric., 12(2): 152-160
- D.G.A.F. (1983) Dirección general de aprovechamientos forrajeros.

Delmas J. (1979). Mushroom Science X. Proceedings of the Xth. International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Francia (1978).

Efflånd, J.M. (1977). Modified Procedure to Determine Acid-insoluble Lignin in Wood and Pulp. TAPPI. 60(10): 143-144.

Eger G. (1978a). New ways of breeding and strain protection for practical mushroom cultivation. In: Mushroom Science X. Delmas J. (Ed.) 1979.

Eger G. (1978b). Biology and breeding of *Pleurotus*. In: The Biology and Cultivation of Edible Fungi. Chang C. y R. Hayes (Ed.). Academic Press New York.

Eger G., G. Eden and E. Wissig (1976). *Pleurotus ostreatus* Breeding potential of a new cultivated mushroom. Theor. & Appl. Genetics. 47:155-63.

Eger G. und H. Leal-Lara (1978) Verfahren zur Dikaryotisierung dikaryotischer Stämme von Basidiomyceten. Deutsches Patentamt, München. P 28 13251,9.

Eger G. und H. Leal-Lara (1979). Verfahren zur Erzeugung neuer genetischen Kombinationen sporeloser Stämme von Basidiomyceten. Deutsches Patentamt, München. P 29 344, 5.

Eger G., S.F. Li and H. Leal-Lara (1979). Contribution to the discussion of the species concept in the *Pleurotus ostreatus* complex. Mycologica 71:577-88.

Eriksson K.E. (1981). Fungal Degradation of Wood Components. Pure and Applied Chem., 53:33-34.

Eriksson K.E. and L. Vallander (1982). Properties of pulps from thermomechanical pulping of chips pretreated with fungi. Svensk papperstidning. 25(6):33-38.

Guzmán G. (1977). Identificación de los hongos. Limusa, México.

Han Y. W. and C.D. Callihan (1974). Cellulose fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth. Appl. Microbiol., 27(1):159-65.

Jablonsky I. (1975). Einfluss der Belichtungsintensität und anderer Faktoren des Milieus auf die Entwicklung der Fruchtkörper des Austernseitlings *Pleurotus ostreatus*. (Jacq. ex. Fr.) Kumm. Ceska Mycologica. 29(3):140-52.

Kirk K. T. (1971) Effects of Microorganismson Lignin. Ann. Rev. of Phytopathol., 9: 185-210.

Kirk T.K., J.M. Harkin and E.B. Cowling (1968). Lignin degradation. Biochem. & Biophys Acta. 165:145.

Kirk T.K. and W.E. Moore (1972) Removing lignin from wood with white-rot fungi and digestibility of resulting wood. *Wood Fiber*. 4:172-79.

Kirk T.K. and H.M. Chang (1974). Descomposition of lignin by white-rot fungi. *Holzforschung*. 28(6):217-22.

Kirk T.K. and H.M. Chang (1975). Descomposition of lignin by white-rot fungi. *Holzforschung*. 29(2):56-64.

Kirk T.K. , W.J. Cornors and J.G. Zeikus (1977). Advances in understanding the microbiological degradation of lignin. In: *The Structure, Biosynthesis and Degradation of Wood*. Loewus F.A. y V.C. Runeckles (Ed.). Recent Adv. Phytochem., Vol. II, Plenum Press, New York.

Klein, B. and Weissman, M. (1953) New Color Reagent for Determination of Hexoses: Determination of Glucose in Blood Serum. *Anal. Chem.*, 25(5): 771-774.

Leal-Lara H. (1978). Is sporelessness in *Pleurotus ostreatus* an infectious agent? In: *Mushroom Science X*. Delmas J. (Ed.). 1979.

Leal-Lara H. (1980). Sporelessness in the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. A. Genetical Study by Means of a New Dedikaryotization Method. Discertacion Doctoral de la Facultad de Farmacia y Quimica de Alimentos. Philipps Universitat, Marburg, Alemania.

Leal-Lara H. and G. Eger (1980). A new symmetrical dedikaryotization method and its importance for identification and breeding of industrial fermentation strains. Abstracts of the Vith. International Fermentation Symposium. London, Canada.

Leal-Lara H. and G. Eger-Hummel (1982). A monokaryotization method and its use for genetic studies in wood-rotting Basidiomycetes. *Theor. & Appl. Genetics.*, 61. 65-68.

Lelley J. und F. Schmaus (1976). *Pilzanbau. Handbuch des Erwerbsgartners* Bd. 12. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart.

Li, S.F. (1980). Studies of the Tolerance to Elevate Temperatures in *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. A contribution to taxonomy and the genetics of the fruiting process. Cramer Verlag. Braunschweig.

Markhijani A. and A.D. Poole (1975). *Energy and Agriculture in the Third World*. Ballinger Press. Cambridge, Mass.

Mateles, R. and S.R. Tannabaum (1968). *Single Cell Protein*. MIT Press. Cambridge, Mass.

Mc. Manus W.R. (1976). Alkali effects on Agricultural wastes and their cell wall fraction. Aust. J. Exp. Agric. & Anim. Husb., 18:231-42.

Omori S. (1974). Some discussions about the cultivation of *Pleurotus ostreatus* on Sawdust bed. In: Mori H. (Ed.). Mushroom Science IX. Part 1:663-67.

Omori S., M. Konno and E. Yoshida (1977). Studies Forest on the utilization of Waste paper II. Bulletin of the Iwate University No. 8, Japon.

Stanton W.R. (1977). The microbes potential in resource economy. Proceedings of the Vth. Symposium of the Federation of European Microbiological Societies. Viena (Austria). pp. 195-215.

Streeter C.L., K.E. Conway and G.W. Horn (1981). Effect of *Pleurotus ostreatus* and *Erwinia carotovora* on wheat straw digestibility. Mycologica 73:1041-1048.

Tannenbaum S.R. t D.I.C. Wang (1975). Single-Cell Protein II. MIT Press. Cambridge, Mass.

Tracey, M. V. (1950) Colorimetric Method for the Determination of Pentoses in the Precence of Hexoses and Uronic Acid. Biochem. J., 47: 443-436.

Walton A.G. and J. Blackwell (1973). Biopolymers. American Press, New York.

Wilkie C.R. (1975). Cellulose as a Chemical and Energy Source. John Wiley & Sons., New York.

Yang H.H., M.J. Effland and T.K. Kirk (1980). Factors Influencing fungal degradation of lignin in a representative lignocellulosic thermomechanical pulp. Biotechnol. & Bioingeneer., 22:65-77.

Zadrazil F. (1975). Die Zersetzung des Stroh-Zellulose-Lignin komplexes mit *Pleurotus florida* und dessen Nutzung. Zeitschrift für Pflanzenernahrung und Bodenkunde. 3:263-78.

Zadrazil F (1976). Freisetzung Wasserloslicher Verbindungen während der Strohzeretzung durch Basidiomyceten als gründlage für eine biologische Strohaufwertung. Zeitschrift für Acker- und Pflanzenanbau. 142:44-53.

Zadrazil F. (1977). Conversion of plant waste to feed by fungi. Abstracts of the Vth. Symposium of the Federation of European Microbiological Societies. Viena, Austria.

Zadrazil F. und H. Brunnert (1979). Der Einfluss von Amonium nitrat auf das Wachstum und das Strohabauvermogen hoherer Pilze. Zeitschrift für Pflanzenernahrung und Bodenkunde. 142:446-55.