



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN
DE *TRICHODERMA SPP.***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacobiólogo

PRESENTA:

Ricardo Salazar González

DIRECTORA DE TESIS:

Doctor en Ciencias Farmacológicas

Virginia Angélica Robinson Fuentes

MORELIA, MICHOACAN, JUNIO DEL 2015.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Desarrollo Analítico de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, bajo la asesoría de la D.C. Virginia Angélica Robinson Fuentes.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. MARCO TEÓRICO	13
2.1 REINO FUNGI	13
2.2 PARED CELULAR FÚNGICA	14
2.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ORGANIZACIÓN DE LA PARED CELULAR FÚNGICA.....	14
a) ORIGEN DE CARGA DE SUPERFICIE CELULAR	17
2.3 ESPORAS FÚNGICAS	18
2.4 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LOS HONGOS.....	18
2.5 TRICHODERMA	19
a) TAXONOMÍA DE <i>TRICHODERMA</i>	19
b) CARACTERES MORFOLÓGICOS Y ESTRUCTURALES.....	20
c) NUTRICIÓN	21
d) <i>TRICHODERMA</i> : SUPERVIVENCIA Y DISPERSIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE	22
e) CICLO DE VIDA DE <i>TRICHODERMA</i>	22
2.6 LOS ESTÍMULOS AMBIENTALES QUE INDUCEN LA FORMACIÓN DE CONIDIOS EN TRICHODERMA.....	23
2.7 INFLUENCIA DEL ESTADO NUTRICIONAL SOBRE LA CONIDIACIÓN	23
2.8 INFLUENCIA DEL pH EN EL PROCESO DE LA FORMACIÓN DE CONIDIAS.....	24
2.9 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE <i>TRICHODERMA</i>	24
2.10 IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE CÉLULAS FÚNGICAS	25
2.11 TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ANÁLISIS DE HONGOS	26
2.12 ELECTROFORESIS CAPILAR	27
2.13 COMPONENTES DE UN SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR	28
2.14 CARACTERÍSTICAS DEL BUFFER DE CORRIMIENTO.....	30
2.15 ORDEN DE MIGRACIÓN DE ANALITOS	30
2.16 APLICACIONES GENERALES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR	31
III. JUSTIFICACIÓN.....	32
IV. OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	33
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	33
V. PARTE EXPERIMENTAL	34
5.1 REACTIVOS.....	34
5.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	35
5.2.1 AGAR VOGEL	35
5.2.2 MEDIO MÍNIMO VOGEL MODIFICADO PARA FUENTES DE CARBONO	35

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

5.2.3 MEDIO MÍNIMO VOGEL MODIFICADO PARA FUENTES DE NITRÓGENO	35
5.3 CULTIVO.....	36
5.4 CEPA ESTUDIADA	36
5.5 CRECIMIENTO EN EL MEDIO IDEAL	36
5.6 MORFOLOGÍA Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO	36
5.7 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	36
5.8 EQUIPO Y ACONDICIONAMIENTO DE CAPILAR	37
5.9 OBTENCION DE CONIDIAS	37
5.10 CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
MORFOLOGÍA Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO INCUBACIÓN A 28 °C	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS CONIDIAS OBTENIDAS EN EL MEDIO VOGEL MODIFICADO	56
VI. CONCLUSIONES	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
VIII. ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Micografía de una hifa. A) Hifas cenocíticas; B) Hifas septadas.....	14
2. Estructura de la β -1,3-glucano.....	15
3. Estructura de la Quitina.....	15
4. Organización de la Pared Celular Fúngica.....	16
5. El conidióforo de <i>Trichoderma atroviride</i>	21
6. Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar.....	29
7. Orden de migración de analitos.....	31
8. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH 5 con incubación a 28 °C.....	41
9. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH 5 con incubación a 28 °C.....	41
10. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH normal con incubación a 28 °C.....	43
11. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Nitrógeno a pH normal con incubación a 28 °C.....	43
12. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH 7 con incubación a 28 °C.....	44
13. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Nitrógeno a pH 7 con incubación a 28 °C.....	45
14. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH 8 con incubación a 28°C.....	46
15. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Nitrógeno a pH 8 con incubación a 28 °C.....	47
16. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono y Nitrógeno con incubación a 28 °C.....	50
17. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel a pH normal con incubación a 28 °C.....	51
18. Conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040 visto a 40 X.....	56
19. Electroferogramas de las conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> IMI-206040 obtenidas con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno a pH 5 del medio. El buffer de corrimiento fue HEPES 10mM, pH 7 con CTAB 15 mM añadido a la muestra. Los análisis se realizaron a -17 KV. Demás condiciones se detallan en la parte experimental. t_m , corresponde al tiempo de migración.....	57

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

- 20.** Electroferogramas de las conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 obtenidas con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno a pH normal (5.9) del medio. El buffer de corrimiento fue HEPES 10mM, pH 7 con CTAB 15 mM añadido a la muestra. Los análisis se realizaron a -17 KV. Demás condiciones se detallan en la parte experimental. t_m , corresponde al tiempo de migración.....57
- 21.** Electroferogramas de las conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 obtenidas con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno a pH 7 del medio. El buffer de corrimiento fue HEPES 10mM, pH 7 con CTAB 15 mM añadido a la muestra. Los análisis se realizaron a -17 KV. Demás condiciones se detallan en la parte experimental. t_m , corresponde al tiempo de migración.....58
- 22.** Electroferogramas de las conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 obtenidas con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno a pH 8 del medio. El buffer de corrimiento fue HEPES 10mM, pH 7 con CTAB 15 mM añadido a la muestra. Los análisis se realizaron a -17 KV. Demás condiciones se detallan en la parte experimental. t_m , corresponde al tiempo de migración.....58

ÍNDICE DE TABLAS

1. CONSTITUYENTES COMUNES DE LAS DIVISIONES DEL REINO FUNGI.....	16
2. REACTIVOS.....	34
3. REACTIVOS FUENTES DE CARBONO.....	34
4. REACTIVOS FUENTES DE NITRÓGENO	35
5. CEPA ESTUDIADA Y CONDICIONES DE CULTIVO	36
6. ACONDICIONAMIENTO INICIAL DEL CAPILAR.....	37
7.MÉTODO UTILIZADO PARA LOS CORRIMIENTOS ELECTROFORÉTICOS	37
8.LAVADO FINAL DEL CAPILAR	37
9. PREPARACIÓN DE BUFFER Y SURFACTANTE	38
10. CINETICA DE CRECIMIENTO <i>Trichoderma spp.</i> a pH 5.....	40
11. CINETICA DE CRECIMIENTO <i>Trichoderma spp.</i> a pH sin modificar (5.90).....	42
12. CINETICA DE CRECIMIENTO <i>Trichoderma spp.</i> a pH 7.....	44
13. CINETICA DE CRECIMIENTO <i>Trichoderma spp.</i> a pH 8.....	46
14. CINETICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO MODIFICADO (FRUCTUOSA-ALANINA)..50	
15. CINETICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO MINIMO VOGEL.....	51
16. ANOVA. COMPARACIÓN ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LOS DIFERENTES VALORES DE pH Y DIFERENTES FUENTES DE CARBONO	52
17. PRUEBA <i>t</i> . DIFERENCIAS ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LOS DISTINTOS VALORES DE pH	53
18. ANOVA. COMPARACIÓN ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LOS DIFERENTES TIPOS DE CARBOHIDRATOS Y LOS VALORES DE pH.....	53
19. ANOVA. COMPARACIÓN ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LAS DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO.....	54
20. PRUEBA <i>t</i> . DIFERENCIAS ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LOS DISTINTOS VALORES DE pH.	54
21. ANOVA. COMPARACION ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO DEBIDAS A LOS DIFERENTES TIPOS DE FUENTES DE NITRÓGENO.	55
22. PRUEBA <i>t</i> . COMPARACIÓN ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SILVESTRES EN EL MEDIO MÍNIMO VOGEL Y EL MEDIO VOGEL MODIFICADO.....	56
23. PRUEBA <i>t</i> . COMPARACIÓN ENTRE LOS VALORES DE TIEMPOS DE MIGRACIÓN OBTENIDOS PARA LAS CONIDIAS OBTENIDAS BAJO LAS DIFERENTES CONDICIONES DE pH.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

BGE	Buffer de corrimiento
CZE	Electroforesis Capilar de Zona
di	Diámetro interno
EC	Electroforesis Capilar
FEO	Flujo Electroosmótico
h	Horas
ISTH	Subcomisión Internacional sobre Taxonomía de <i>Trichoderma / Hypocrea</i>
kV	Kilovoltio
Λ	Longitud de onda
LIF	Luz infrarrojo
μ A	Microamperes
μ_{ap}	Movilidad electroforética aparente
μ_{ep}	Movilidad electroforética
μ m	Micrómetro
mM	Milimolar
UV	Ultravioleta
V	Velocidad electroforética
ζ	Potencial zeta
t_m	Tiempo de migración
UV	Ultravioleta

RESUMEN

El análisis de los hongos contribuye al entendimiento de fenómenos biológicos como son interacciones célula-célula, respuesta inmune, resistencia a medicamentos; así como al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, el aprovechamiento de sus diversas propiedades en áreas de interés médico y biotecnológico, por mencionar ejemplos. Los componentes de la pared celular de los hongos, como la quitina, β - α glucanas, manoproteínas, lípidos, pigmentos y sales orgánicas e inorgánicas dan forma y protección a los hongos contra daños físicos y les confieren propiedades fisicoquímicas utilizadas para su identificación y caracterización. Las conidias y/o esporas de los hongos son el medio de diseminación y es a través de éstas que se pueden identificar especies fúngicas. En este estudio se analizó el efecto de la fuentes de carbono, nitrógeno y pH, sobre la germinación, velocidad de crecimiento y conidiación de *Trichoderma atroviride* IMI 206040. Además, se usó la Electroforesis Capilar para detectar posibles cambios en las superficies celulares por efecto del medio de cultivo.

La cepa en estudio se sembró en agar Vogel para posteriormente ser inoculada en los demás medios con diferentes fuentes de carbono (glucosa, dextrosa, maltosa, lactosa, fructuosa, xilosa, albumina), de nitrógeno (nitrito, nitrato, urea, cisteína, alanina) y pH (5, sin modificar, 7, 8) e incubar a 28°C. Se registró la velocidad de crecimiento y la aparición de conidias midiendo el diámetro de crecimiento con vernier cada 24 h. Se colectaron las conidias y fueron lavadas con H₂O estéril para eliminar restos de micelio, agar y metabolitos. Se empleó el *Sistema de Electroforesis Capilar P/ACE MDQ Beckman Coulter®* con DAD a 201 nm, T=25°C, (-) 17Kv. Se utilizó un capilar de sílice fundida de 100 μ m de d.i. y 50 cm de L_T. Los corrimientos electroforéticos se realizaron con un buffer de corrimiento (BGE) HEPES 10mM, pH 7.

Se encontró que la Fructosa, como fuente de C, y la Alanina, como fuente de N, a pH entre 5 y 6, ocasionaron un rápido crecimiento y conidiación del hongo, que se duplica al usar ambos sustratos. Con esto, los tiempos de conidiación se redujeron a dos días. Tales condiciones ocasionaron, también, un rápido crecimiento y conidiación de 4 cepas silvestres de *Trichoderma* sin necesidad de someter a estrés mecánico. Los análisis electroforéticos de las conidias produjeron señales con t_m similares con formas con un patrón de pico similar que presuntamente es indicativo de que la pared de las conidias no sufre ningún cambio o modificación significativos, al menos no detectable por electroforesis capilar.

Palabras clave: conidias, *Trichoderma atroviride*, electroforesis capilar, fuente de carbono, fuente de nitrógeno.

ABSTRACT

Fungal analysis contributes to understand different biological phenomena such as cell-cell interactions, the immune response, drug resistance, etc.; this knowledge is useful to develop new diagnostic methods and to make the most of their properties in the medical and biotechnological areas. The cell wall components in fungi such as quitine, β - α glucans, manoproteins, lipids, pigments, and organic and inorganic salts give shape to their cells and protect them against physical damage and also provide them with a surface net charge. Fungal spores or conidias are responsible for perpetuation of the species and can also be used to identify genera or species. Thus, in this work the effect of different C and N sources as well as pH on the growth and conidiation of *Trichoderma atroviride* IMI 206040 was studied. Capillary Electrophoresis was used in order to detect possible changes in the conidial surface as a consequence of growing under different conditions.

Trichoderma atroviride IMI 206040 was cultured in Vogel Agar and then cultured again in modified Vogel Agar with different sources of C (glucose, dextrose, maltose, lactose, fructose, xilose and albumin), N (nitrite, nitrate, urea, cystein, alanin) and pH (5, 5.9, 7, 8). Incubation took place at 28°C. Growth curves were obtained by measuring the fungal diameter every 24 h with a vernier. Conidia were harvested and washed three times with sterile distilled water and suspended in BGE for electrophoretic analysis. They were analyzed in a Capillary Electrophoresis system (P/ACE MDQ Glycoprotein System, Beckman Coulter) equipped with DAD at 201 nm, T=25°C, (-) 17 V, 100 μ m i.d. capillary with 50 cm L_T. BGE: HEPES 10 mM, pH 7.

Fructose, as C source, and Alanin, as N source, at pH 5-6 promoted fast growth and conidiation of *Trichoderma atroviride* IMI 206040. When both compounds were used together, the growth is twice as fast as when they were used individually. Under these conditions, conidia can be obtained in two days whereas in normal Vogel, they take more than 5 days. Four wild strains of *Trichoderma* were also tested in this new culture medium and all of them grew fast and produced conidia without mechanical damage stress to the fungi. Electrophoretic analysis of conidia produced signals with very similar t_m and peak shapes. Therefore, there are no significant changes in the conidia surfaces that can be detected by Capillary Electrophoresis.

Keywords: Conidia, *Trichoderma atroviride*, Capillary Electrophoresis, C source, N source

I. INTRODUCCIÓN

El análisis, caracterización e identificación de los hongos es crucial en diversas áreas del conocimiento, por ejemplo son relevantes en la industria alimenticia, farmacéutica, en el área de la medicina y en el sector público (Alexopoulos y Mims, 1985). Desde el punto de vista médico-clínico, es imprescindible la búsqueda e identificación del factor etiológico de una enfermedad infecciosa, lo cual es un paso necesario para el control y tratamiento de la enfermedad. Así mismo, en la industria alimenticia la presencia de hongos y sus metabolitos en los alimentos y granos en almacenamiento, pueden traer como resultado pérdidas económicas considerables, aunado a esto, las enfermedades producidas por productos contaminados son el resultado directo de graves problemas en la salud. El análisis de los hongos puede conducir al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades. En biotecnología, se ha incrementado el uso de los hongos en la obtención de alimentos y bebidas. Además, los hongos filamentosos producen el 25% de los antibióticos conocidos hasta el momento (López *et al.*, 2006).

La identificación de los hongos se realiza principalmente mediante cultivos y observación microscópica. De esta manera se obtiene información sobre la morfología del hongo; sin embargo, estas técnicas requieren de tiempos largos de análisis debido a la preparación de la muestra y a su cultivo. Hoy en día existen nuevas metodologías como la detección de antígenos y/o anticuerpos, y la biología molecular; aunque para éstas se requiere de instrumentos sofisticados y personal altamente especializado, además de que la preparación de la muestra requiere de pasos complicados, reactivos caros y gran consumo de tiempo. Debido a estos inconvenientes es indispensable el desarrollo de una técnica rápida para la identificación y caracterización de hongos. Los componentes de la pared celular fúngica pueden contribuir al desarrollo de métodos de diagnóstico basados en su identificación. La pared celular fúngica está constituida por polisacáridos como quitina, β y α – glucanas, y glicoproteínas; además, contiene pequeñas cantidades de lípidos, pigmentos como la melanina y sales orgánicas e inorgánicas. La composición predominante de los constituyentes de la pared celular, varía según el grupo taxonómico y le confiere diversas características a cada tipo de especie (Cázares, 2009).

En este trabajo proponemos realizar una cinética de crecimiento mediante la privación y adhesión de nutrientes o de fuentes de nutrientes además de modificar concentraciones, pH y temperaturas con el fin de encontrar los factores determinantes que son señales universales para la formación de conidios en hongos

y así lograr una rápida conidiación para un pronto análisis, las cepas de *Trichoderma* son muy útiles para realizar este estudio debido a su rápido crecimiento, abundante conidiación y que la composición química de pared celular de estos hongos es muy parecida a las características que presentan la mayoría de los ascomicetos filamentosos . Acompañado de la EC que es un punto fundamental para el estudio y caracterización de esporas fúngicas tomando en cuenta para ello los componentes generales de las paredes celulares de los hongos y con esto obtener información sobre su comportamiento electroforético. La utilidad de realizar estos estudios es para buscar nuevas formas de identificación, cuantificación y comprensión de sus propiedades de interacción/repulsión, con esta técnica se obtendrán resultados en cortos tiempos de análisis, de manera económica y con buena sensibilidad.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 REINO FUNGI

Los hongos son organismos eucarióticos, aerobios y heterótrofos que poseen paredes celulares rígidas; incluyen desde organismos unicelulares hasta organismos pluricelulares macroscópicos. Debido a que carecen de clorofila, requieren una fuente externa de carbono y, de acuerdo con la clase de sustancia orgánica que aprovechen, actúan como saprófitos, parásitos o simbióticos. Son organismos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza; constituyen uno de los cinco reinos de los seres vivos, el reino Fungi (Eumycotas), el cual actualmente está clasificado en los filos *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Glomeromycota*, *Zygomycota* y *Chtridiomycota* (James *et al.*, 2006). Los hongos poseen gran diversidad de formas y tamaños y pueden vivir en sustratos y condiciones ambientales muy variadas. Pueden subsistir en intervalos de pH muy amplios, aunque la mayoría viven en medios ligeramente ácidos, entre 6.0 y 6.5. La temperatura más adecuada para su desarrollo es de 25 a 28 °C. Además, la humedad relativa de 60 a 80% es importante para el desarrollo y fructificación de los hongos filamentosos (Herrera y Ulloa, 1998).

El conjunto de células agrupadas de manera lineal forma una hifa [Fig. 1], que puede ser cenocítica cuando el citoplasma se encuentra completamente comunicado entre célula y célula, o septado cuando existe una separación entre células denominada septo, el conjunto de hifas forma un micelio; este micelio es muy ramificado y gran parte de sus hifas se despliegan dentro y sobre el sustrato para alimentarse de él, denominándose esta región micelio vegetativo, mientras que la otra región que presenta estructuras diferenciadas para la reproducción recibe el nombre de micelio aéreo o reproductivo. La reproducción en el reino Fungi se puede efectuar mediante dos mecanismos: un mecanismo sexual (teleomorfismo) generando esporas, o por un mecanismo asexual (anamorfismo) generando conidias (Alexopoulos y Mims, 1985; López *et al.*, 2006; Fischer y Kües, 2006). El micelio vegetativo, inmerso en el sustrato, se encarga de la absorción y transformación de nutrientes, mientras que el micelio aéreo, soporta las estructuras y formas de reproducción. La reproducción de un hongo puede ser sexual o asexual. Las estructuras de reproducción, por tanto, pueden ser de tipo sexual, denominándose esporas, en tanto que las de tipo asexual se denominan conidias (Koneman *et al.*, 1999).

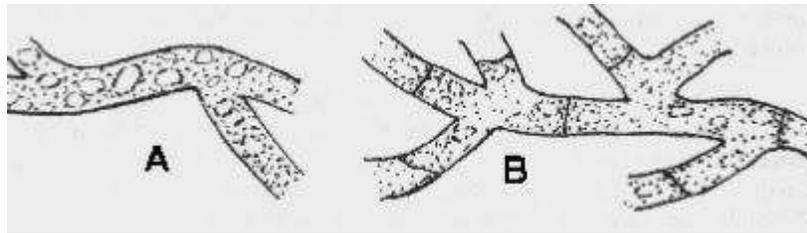


Fig 1. Micografía de una hifa A) Hifas cenocíticas; B) Hifas septadas.
<http://images.google.es>

Los hongos contienen una pared celular conformada principalmente por glucanas, glicoproteínas y quitina; este último polisacárido está presente en todos los organismos fúngicos; en la membrana celular contienen ergosterol;

2.2 PARED CELULAR FÚNGICA

La mayoría de las células fúngicas ya sean hifas o esporas, están rodeadas por una pared celular, la cual es una estructura rígida que rodea la célula por la parte externa de la membrana plasmática y es esencial para el mantenimiento de la integridad del microorganismo. Constituye entre el 15 y 30% del peso seco de la célula. Es la encargada de dar la forma a la célula fúngica, así como de controlar la permeabilidad y protegerla de los daños químicos, mecánicos y osmóticos. Además de estas importantes funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella una amplia variedad de moléculas que actúan como receptores, que tras su activación, desencadenan una cascada de señalización en el interior de la célula. La interacción entre hongo y hospedero ocurre primeramente a nivel de la pared celular, por lo que juega un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica. Desde el punto de vista molecular, esta estructura rígida y aparentemente estática es realmente muy dinámica, sufriendo modificaciones importantes a lo largo del ciclo celular o de procesos como la formación de septos, la esporulación y el crecimiento, por ejemplo (Pontón, 2008).

2.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ORGANIZACIÓN DE LA PARED CELULAR FÚNGICA

La glucana es el polisacárido estructural más importante de la pared celular de los hongos y representa del 50 al 60% del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucana están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90%), aunque también están presentes glucanas con enlaces β -1,6, α -1,3 y α -1,4. La β -1,3-glucana es el componente más abundante de la pared, compuesto por cadenas de unas 1500 unidades de glucosa unidas mediante enlaces β -1,3-O-glucosídicos [Fig. 2].

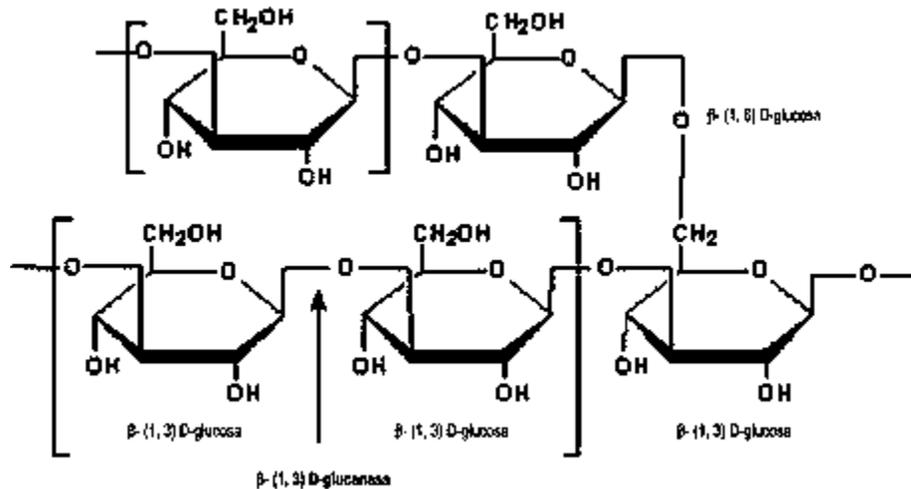


Fig 2. Estructura de la β -1,3-glucana. (Adams, 2004)

La β -1,6-glucana, juega un papel fundamental en la estructura de la pared celular, ya que enlaza todos los componentes de la misma. Otro componente indispensable en la pared celular de los hongos es la quitina. La quitina es un polímero estructural formado por cadenas de 120 a 170 residuos de *N*-acetil-*D*-glucosamina con uniones β -1,4 [Fig. 3]. Las cadenas de quitina se localizan principalmente en la zona próxima a la membrana plasmática. La función de los polímeros de glucana y de la quitina es la de proporcionar a la pared celular fuerza mecánica y rigidez, además de que contribuyen a la insolubilidad de éstos en álcali.

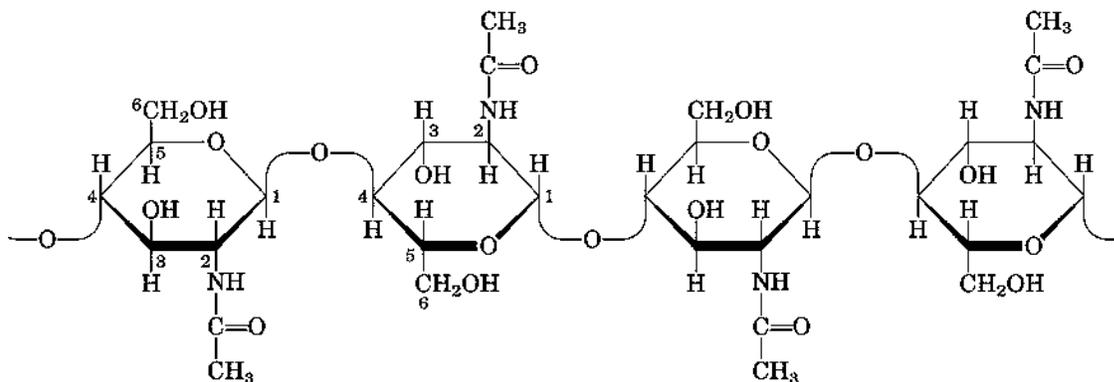


Fig 3. Estructura de la quitina. <http://www.scientificpsychic.com>

Otros componentes importantes de la pared celular son las proteínas, las cuales se encuentran unidas a carbohidratos. Se trata de glicoproteínas con una porción glucosídica unida por medio de enlaces *O*-glucosídicos o *N*-glucosídicos. Las más estudiadas han sido las manoproteínas, polipéptidos que llegan a tener hasta 95% de carbohidratos. Funcionalmente se trata de proteínas que actúan como enzimas

y antígenos de la pared, participan en el mantenimiento de la forma celular, en la transmisión de señales al citoplasma y en la remodelación de los componentes de la pared. Además, juegan un importante papel en la porosidad de la misma, participando en la absorción de moléculas y en ciertos hongos patógenos en aspectos relacionados con la patogenicidad como son la adhesión a tejidos y la inmunogenicidad que generan. Los lípidos se encuentran en una proporción del 2 al 10%, constituidos por ácidos grasos saturados, siendo los más abundantes C16 y C18. Son los encargados de dotar de flexibilidad, tersura y da carácter hidrofóbico a las células fúngicas. Además de estos componentes, se encuentran presentes en la pared celular pigmentos tales como la melanina, producto de la oxidación de diversos fenoles, cuya función es la de proteger a la hifa y esporas de la luz UV; es esencial para la patogénesis y anclaje a las diferentes superficies, se encuentra asociada a quitina y está relacionada con la resistencia a la lisis. En muy baja proporción, se encuentran sales inorgánicas y orgánicas que pueden estar constituidas tanto por cationes como por aniones. Los componentes de la pared celular fúngica, varían de acuerdo a las condiciones del medio que los rodea, además su composición puede variar con la edad del hongo. Por otro lado, el tipo y cantidad de polisacáridos varía según el grupo taxonómico [Tabla 1] (Pontón, 2008; Adams, 2004).

Tabla 1. CONSTITUYENTES COMUNES DE LAS DIVISIONES DEL REINO FUNGI.		
División	Compuestos fibrilares	Compuestos amorfos
Basidiomycota	Quitina β -1,3, β -1,6-Glucana	Xylomanoproteinas α -1,3-Glucana
Ascomycota	Quitina β -1,3, β -1,6-Glucano	Galactomannoproteins α -1,3-Glucano
Zygomycota	Quitina Quitosan	Ácido poliglucurónico Glucuronomanoproteinas Polifosfato
Chytridiomycota	Quitina Glucano	Glucano

En la organización de la pared fúngica se puede observar que está dispuesta en capas, según estudios de microscopía electrónica, con una región externa muy electrodensa de aspecto fibrilar y rica en manoproteínas y una capa interna amorfa, constituida básicamente por β -1,3-glucana, que a su vez consta de dos zonas: una interior menos amorfa vecina a la membrana plasmática y rica en proteínas, y una

más externa, que contiene una proporción importante de β -1,6-glucana. Las fibras insolubles de β -1,3-glucana se distribuyen alrededor de la superficie de la célula, uniéndose mediante un enlace covalente a las cadenas de quitina y conformando así la parte interna de la pared celular. Hacia el exterior de la pared se sitúan las manoproteínas unidas al extremo no reductor de las moléculas de β -1,3-glucano. También están presentes en la pared las proteínas unidas a quitina mediante cadenas cortas de β -1,6-glucano, aunque en menor proporción [Fig. 4] (Pontón, 2008; Adams, 2004).

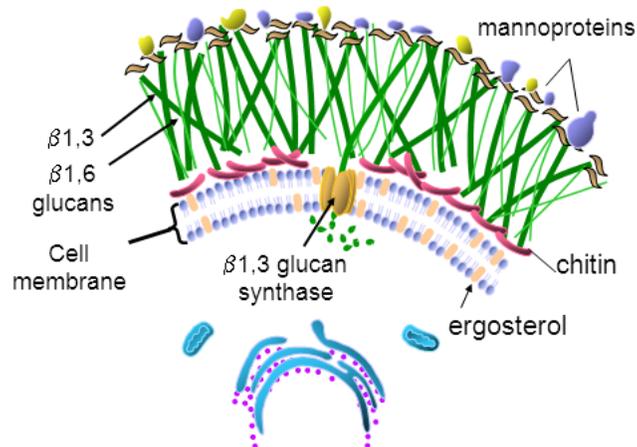


Fig 4. Organización de la Pared Celular Fúngica. <http://www.scientificpsychic.com>

a) ORIGEN DE CARGA DE SUPERFICIE CELULAR

Las conidias poseen una carga neta negativa debido a la ionización de grupos de superficie, por ejemplo, glicolípidos, grupos carboxilos, aminoácidos; esto permite que existan fuerzas fisicoquímicas de atracción/repulsión derivadas de fuerzas electrostáticas y fuerzas de van der Waals entre la carga de superficie de la conidia y el sustrato, la magnitud de estas cargas varía durante el día; la adhesión de conidias es el resultado de la interacción entre la naturaleza fisicoquímica de la superficie celular y de una superficie o tejido celular, es el primer paso antes de la germinación. La interacción entre conidias cargadas y el sustrato es tal que, a una baja concentración de electrolitos, una barrera significativa de energía debe ser superada para que la conidia se ponga en contacto con la otra superficie, cuando la concentración del analito aumenta, la barrera de energía disminuye y se produce una fuerte atracción entre la conidia y el sustrato; las conidias tienden a sedimentar por acción de la gravedad (Carlile *et al.*, 2001; Shaw y Hoch, 2007).

2.3 ESPORAS FÚNGICAS

Como resultado de la reproducción sexual y asexual, en los hongos se producen esporas características para cada grupo de hongo. En muchos hongos, las esporas no poseen pared celular y son flageladas, aunque la mayoría carecen de flagelos y tienen caracteres sumamente distintos. Todas son microscópicas, las hay muy pequeñas, de unos cuantos μm hasta 20 μm . Poseen colores variables, desde hialinas hasta oscuras. Su forma puede ser esférica, cilíndrica u ovoide.

2.4 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LOS HONGOS

Los hongos filamentosos han sido utilizados por la biotecnología como fábricas celulares de muchos productos; metabolitos primarios como el ácido cítrico, secundarios como los antibióticos y por supuesto las enzimas. Los avances en los métodos moleculares han sido determinantes en el desarrollo de cepas industriales de gran productividad. Así mismo, y debido a su origen ancestral y gran diversidad, los hongos han sido un excelente modelo para estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y de evolución en eucariontes. Se han descrito alrededor de 100,000 especies de hongos de los cuales, a pesar de la gran diversidad que se encuentra en la naturaleza, solo unos cuantos son utilizados. En nuestros días se tienen más de 100 genomas fungicos secuenciados y muchos más en proceso. Esto ha ampliado el potencial de aplicación de los hongos más conocidos y utilizados (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*), y ha incorporado el uso de otros menos estudiados (Boa, 2004).

El reciente desarrollo de disciplinas como la genómica, proteómica y otras “ómicas”, conjuntamente con la bioinformática, han dado un impulso muy importante al desarrollo de las ciencias de la vida. Hoy es posible por ejemplo, mediante espectrometría de masas, identificar cientos de proteínas de diversos sistemas biológicos en un solo paso. Estas herramientas también han dado un impulso considerable al desarrollo de la biotecnología de hongos (Guzmán, 2008).

La biotecnología de hongos, en el sentido más amplio del término, se ha desarrollado considerablemente en el mundo, incluido nuestro país, observándose el surgimiento de numerosos grupos de investigación y publicaciones en el área. En México existe una gran biodiversidad microbiana pero son pocos los estudios orientados a la consolidación de estrategias globales para la identificación y caracterización de un acervo de hongos autóctonos, así como para su secuenciación y anotación (Aguilar, 2012).

2.5 TRICHODERMA

El género *Trichoderma* es un grupo de hongos de rápido crecimiento, presenta pigmentos conidiales de color verde brillante o blanco; las cepas de *Trichoderma* raramente están asociadas a enfermedades de las plantas, en cambio interactúan con ellas de manera mutualista protegiéndolas de microorganismos fitopatógenos, este tipo de hongos son muy agresivos en sus nichos ecológicos compitiendo contra los demás microorganismos; son considerados degradadores secundarios de lignocelulosa, son necrófitos (Klein y Eveleigh,2002; Gams y Bissett,2002).

a) TAXONOMÍA DE TRICHODERMA

El género *Trichoderma* fue propuesto por Person en 1794 con cuatro especies. En 1969 Rifai propone nueve especies más; posteriormente, Bisset (1984, 1991a, 1991b, 1991c) eleva algunas de las especies agregadas por Rifai a rango de sección, agrupándolas en cuatro secciones: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma* e *Hypocreanum*. Actualmente se tienen alrededor de 100 especies descritas (Samuels, 1996; Kuhls *et al.*, 1997).

Existe una fuerte evidencia de que el género *Trichoderma* visto filogenéticamente, es joven y sigue evolucionando con muchas formas intermedias (Lieckfeldt *et al.*, 1998). Los miembros de las secciones *Pachybasium* y *Trichoderma* tienen una alta variabilidad interespecies e intraespecies (Kuhls *et al.*, 1997). Estas dos secciones contienen especies filogenéticamente relacionadas una con la otra, por ejemplo, *T. harzianum* pertenece a la primera por el carácter morfológico y también a la segunda por análisis de la isoenzima del DNA.

Basándose en la clasificación taxonómica de Alexopoulos y Mims (1979) y Subramanian (1983), el género *Trichoderma* se encuentra dentro del Reino Mycetozoa (fungi); división, Eumycota; subdivisión, Deuteromycotina; clase, hyphomycetes; Orden, Hyphales (Moniliales) y familia, Moniliaceae.

A pesar de su importancia económica, la taxonomía del género es aún problemática y los estudios están basados en la morfología (Samuels, 1996), no obstante, se intenta aclararla utilizando técnicas moleculares, incluyendo huellas y análisis de secuencia (Kuhls *et al.*, 1997) y con datos moleculares y morfológicos se redefinirá lo complejo de varias especies (Lieckfeldt *et al.*, 1998).

Además, todos los análisis filogenéticos realizados a *Trichoderma* e *Hypocrea* son casi idénticos. Samuels (2001) indicó que no hay razón para no pensar que *Trichoderma* es *Hypocrea*.

Considerando las aportaciones de Rossman y col. (1999) y las indicaciones de Samuels (2001), la clasificación taxonómica del género *Trichoderma*, podría ser de la siguiente manera: Reino: Mycetozoa (Fungi); División: Eumycota; Subdivisión: Ascomycotina; Clase: Euascomycetes; Orden: Hypocreales; Familia: Hypocreaceae y Género: *Trichoderma*, *Hypocrea*.

b) CARACTERES MORFOLÓGICOS Y ESTRUCTURALES

Los conidióforos en el género *Trichoderma* pueden aparecer como ramas pareadas que asumen un aspecto piramidal, que termina en una o unas pocas fiálides. Las fiálides pueden ser sostenidas en verticilos o pueden ser penicilados, y pueden ser densamente agrupadas en el eje principal. Las conidias de la mayoría de especies de *Trichoderma* poseen menos de 5 μm de largo y ancho, y pueden ser globosas, subglobosas, elipsoidales u oblongas. La pigmentación de las conidias oscila desde el verde intenso a casi gris pasando por verde y verde amarillo, y la ornamentación puede ser lisa, verrugosa o tubérculos, y es un carácter de especie. Las conidias tienden a acumularse dentro de masas pulvinadas, los agregados formados de hifas entrelazadas produciendo fiálides. Las clamidosporas tienden a ser de globosas a subglobosas, terminales o intercalares de tono verde y menores a 15 μm de diámetro (Samuels, 1996).

Las especies de *Trichoderma* son de crecimiento rápido y las conidias se forman de manera abundante en forma de polvillo; no hay micelio aéreo y la pigmentación es típica en tonos verdes, verde-amarillos; algunos cultivos presentan un olor parecido al coco (Samuels, 1996). El pH del sustrato es importante para manipular el crecimiento y la esporulación. La viabilidad de las conidias puede incrementarse si se almacenan a un pH de 6.0. Bajo condiciones de campo requiere humedad relativa alta para sobrevivir más tiempo (Agosin *et al.*, 1997).

Trichoderma spp. se encuentran en diferentes hábitats y suelos, la presencia de varias especies difiere entre hábitat y están influidas por las condiciones ambientales. Las especies de *Trichoderma* están presentes en aire y en partes aéreas de plantas, y de manera abundante se ha encontrado en suelos, incluyendo humus forestales y madera en descomposición. La presencia de *Trichoderma* spp.,

es diferencial y dependiente del tipo de suelo, de la temperatura y del contenido de humedad (Agosin *et al.*, 1997).

La temperatura óptima del desarrollo difiere entre las especies de *Trichoderma*, la mayoría son mesófilas y no pueden proteger la germinación de semillas contra enfermedades del suelo causadas por cepas fitopatógenas tolerantes al frío durante condiciones de frío y humedad del otoño y primavera (Widden y Abitbol, 1980).

La producción de los metabolitos y biomasa que caracterizan al género depende de la composición del medio donde se desarrolla, es decir de los nutrientes que encuentre y no tanto de la concentración del inóculo (Tronsmo y Harman, 1992).

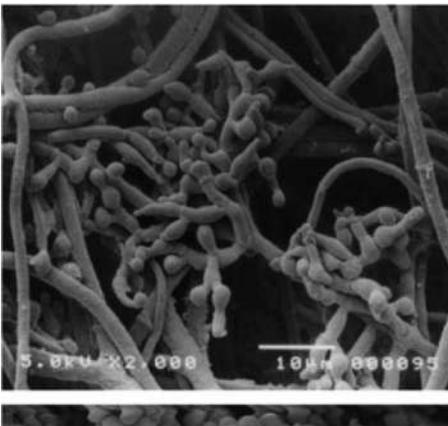


Fig 5. El conidióforo de *Trichoderma atroviride* es simple, con ramificación unilateral o en pares. <http://images.google.es>

En su morfología macroscópica, el micelio inicialmente se encuentra sumergido en el sustrato, para posteriormente desarrollarse a un micelio aéreo de lanoso a algodonoso; su conidiación típicamente es verde, pero en algunas ocasiones es blanca, grisácea o café; su reverso puede no presentar alguna tonalidad, ser amarillento, ámbar o rojo opaco.

c) NUTRICIÓN

Trichoderma crece en una gran variedad de fuentes de carbono, siendo la glucosa la mejor fuente, seguido de fructosa, glucosa, manosa, celobiosa, trehalosa, galactosa y xilosa; la utilización de algunas fuentes de carbono, por ejemplo, inulina, almidón, xilano, pectina, lactosa, sacarosa, maltosa, algunos polioles, azúcares ácidos, algunos aminoácidos y algunas pentosas, pueden ser usados para propósitos quimiotaxonómicos. Aunado a ello, *Trichoderma spp.* degradan una gran variedad de polisacáridos y otros biopolímeros, las enzimas involucradas en los procesos de degradación de estos compuestos tienen una importancia comercial considerable, principalmente las celulasas. Como fuente de nitrógeno pueden

aprovechar diferentes aminoácidos, principalmente de alanina, ácido aspártico y ácido glutámico; existen cepas que también obtienen nitrógeno de bases nitrogenadas. Las fuentes de azufre y fósforo principalmente las obtienen de fosfatos inorgánicos y sulfatos. Los minerales son encontrados en pequeñas cantidades en la mayoría de los sustratos, como por ejemplo, el hierro y el calcio, que ayudarán en el crecimiento y en la conidiación (Kubicek, 2002).

d) TRICHODERMA: SUPERVIVENCIA Y DISPERSIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE

Las conidias se utilizan en las preparaciones comerciales de hongos, tales como los que funcionan como agentes de control biológico contra organismos fitopatógenos, así como los utilizados en los procesos industriales (Druzhinina y Kubicek, 2005).

Como un componente ubicuo y con frecuencia predominante de la micoflora en numerosos suelos (nativas y agrícolas) en todas las zonas climáticas, las especies de *Trichoderma* juegan un papel importante en la salud del ecosistema (Klein & Eveleigh, 1998). Dado que el mecanismo principal para la supervivencia y dispersión de *Trichoderma* es a través de la producción de conidias, la comprensión de los factores que controlan este interruptor morfogénico del crecimiento vegetativo de la reproducción asexual es de gran importancia.

La manera en que actúan los hongos con el medio ambiente, depende de las señales ambientales y las características propias del mismo. Combinaciones de dichas señales ambientales desencadenan la aparición de una variedad de procesos de desarrollo en los hongos, que en algunos casos, desencadenan la formación de conidias en *Trichoderma* (Bahn *et al.*, 2007).

e) CICLO DE VIDA DE TRICHODERMA

La mayoría de las cepas de *Trichoderma* no están asociadas a estados sexuales y se consideran hongos mitóticos estrictos; el ciclo inicia con la germinación de la espora, conidia o clamidoconidia; la germinación involucra la iniciación de actividades bioquímicas, mismas que estuvieron ausentes en la fase de dormancia y es llevada a cabo con un incremento gradual en la velocidad de metabolismo hasta llegar a su nivel normal. Los requerimientos para la germinación son: agua y humedad relativa suficientes, presencia de oxígeno, bióxido de carbono, una temperatura muy semejante a la ideal para el crecimiento vegetativo, nutrientes de bajo peso molecular como glucosa y aminoácidos como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. Inmediatamente después de la germinación se forma la primer hifa que recibe el nombre de tubo germinativo; este tubo germinativo se expande y forma hifas ramificadas, generando una colonia micelial que crece

comúnmente de manera radial. Aunque ciertos estímulos externos pueden dictar una alteración en esa forma de crecimiento, cuando las condiciones son ideales para el hongo, su micelio crece de manera continua; cuando los nutrientes comienzan a disminuir, el crecimiento del micelio vegetativo deja de crecer y comienza la conidiación; esto también depende de la competencia con otros microorganismos y factores como luz y temperatura; la conidiación es llevada a cabo en micelio aéreo a manera de conidias y en micelio vegetativo a manera de clamidoconidias; a nivel de laboratorio, esta fase asexual es la única que se presenta en los cultivos (Carlile *et al.*, 2001).

El ciclo de vida completo anamorfo - teleomorfo tiene lugar bajo óptimas condiciones y tiene la característica de que los organismos que presentan ambos estados sexuales comienzan a desarrollar al mismo tiempo estructuras reproductivas asexuales y sexuales, apareciendo primeros conidias y posteriormente ascas con ascosporas dentro de un ascoma (Jaklitsch, 2009).

2.6 LOS ESTÍMULOS AMBIENTALES QUE INDUCEN LA FORMACIÓN DE CONIDIOS EN *TRICHODERMA*

El medio ambiente representa un conjunto de estímulos que no llegan solos y los organismos detectan y responden a cada uno de ellos de una manera particular para sobrevivir y proliferar. En particular, en *Trichoderma*, se ha demostrado que la formación de conidias está regulada por la luz y las lesiones del micelio (Horwitz *et al.*, 1985; Casas-Flores *et al.*, 2004; Steyaert *et al.*, 2010a). Otros factores que influyen en la formación de conidios incluyen las fuentes de C : N , pH bajo, calcio extracelular, y los compuestos orgánicos volátiles derivados de hongos (VOCs) (Nemcovic *et al.*, 2008; Šimkovič *et al.*, 2008; Steyaert *et al.*, 2010a.).

2.7 INFLUENCIA DEL ESTADO NUTRICIONAL SOBRE LA CONIDIACIÓN

La privación de nutrientes o de diferentes fuentes de nutrientes son señales universales para la conidiación en hongos. En algunas fuentes de carbono, las tasas de crecimiento no se correlacionan con la conidiación; en algunos casos, permiten el crecimiento del micelio lento o muy pobre del hongo; por lo tanto, la conidiación podría ser una respuesta a la necesidad. Sin embargo, hay otras fuentes de carbono en el que hay un crecimiento micelial rápido y la formación de conidias; estos patrones de formación de conidias se piensa que son debidos a diferentes potenciales redox sobre el catabolismo de las fuentes de carbono utilizadas (Friedl *et al.*, 2008). Las fuentes primarias de nitrógeno promueven fuertemente

fotoconidiación lo que sugiere que el efecto interactivo sea en especies (aisladas) específicas (Steyaert *et al.*, 2010c).

2.8 INFLUENCIA DEL pH EN EL PROCESO DE LA FORMACIÓN DE CONIDIAS

En varias especies de *Trichoderma*, el bajo pH parece ser un factor determinante para la formación de conidias. La conidiación inducida por la luz y lesión mecánica es estrictamente bajo la dependencia del pH (Steyaert *et al.*, 2010b). Por lo tanto, la calidad y cantidad de la respuesta parece ser específico de la especie. Se propone que la fotoconidiación depende de un pH intracelular bajo, esto logrado por el bajo pH en el medio ambiente y la acidificación que se produce cuando los micelios se exponen a la luz (Gresík *et al.*, 1991; Steyaert *et al.*, 2010b.). Por consiguiente, la influencia del pH en la conidiación inducida por otras señales ambientales es clara, aunque el pH por sí mismo no parece ser suficiente. Es posible que la luz, daño celular y el hambre de nutrientes también pueden modificar el pH intracelular en condiciones naturales (no tamponados), lo que resulta en la inducción de la expresión de genes que conducen a la formación de conidias (Moreno-Mateos *et al.*, 2007).

2.9 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE *TRICHODERMA*

Las celulasas producidas por *Trichoderma* son utilizadas a nivel industrial en la elaboración de bioetanol a partir de restos de material vegetal, reduciendo los costos de producción de manera importante; también las enzimas son utilizadas en la industria del papel y la industria textil. En la industria alimenticia, *Trichoderma* ha sido empleado para la producción de aditivos alimenticios, sus β -glucanasas se han utilizado para la mejorar el proceso de elaboración de la cerveza; las pectinasas, celulasas y hemicelulasas, han funcionado como enzimas de maceración en la elaboración de jugos de frutas; las xilanasas se han usado como aditivos en el alimento de ganado y de mascotas (Harman *et al.*, 2012).

En el ámbito clínico, *T. longibrachiatum* es la especie más común de este género, es un hongo oportunista que está involucrado en infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, además de ser resistente a la mayoría de los antimicóticos incluyendo anfotericina B; hay reportes de absceso cerebral debido a *T. longibrachiatum* en un paciente leucémico con neutropenia prolongada, peritonitis causada por *T. viride*, *T. koningii* presente en falla renal crónica y *T. viride* causando micoma pulmonar; otras especies reportadas causando infección son *T. pseudokoningii* y *T. harzianum*, todas las especies reportadas fueron confirmadas mediante pruebas moleculares de regiones ITS (Klodzinska y Buszewski, 2009).

2.10 IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE CÉLULAS FÚNGICAS

El análisis, caracterización e identificación de los hongos es crucial en diversas áreas del conocimiento, así como en la industria alimenticia, farmacéutica, en el área de la medicina y en el sector público (Lantz *et al.*, 2007). Desde el punto de vista médico-clínico, es imprescindible la búsqueda e identificación del factor etiológico de una enfermedad infecciosa, puesto que en las últimas dos décadas se ha observado un incremento en la patología fúngica, debido al aumento de pacientes inmunocomprometidos y al uso generalizado de numerosos medicamentos inmunosupresores para el tratamiento y control de enfermedades crónicas, neoplásicas, inmunológicas, etc. (Quindós, 2002). Aunque la mayoría de las micosis continúan siendo superficiales, factores climatológicos, socio-económicos y migratorios, pueden promover al desarrollo y generación de infecciones crónicas, las cuales son asintomáticas y regularmente no son tratadas, lo que en casos graves pueden ocasionar enfermedades sistémicas. Las micosis sistémicas tienen un alto porcentaje de mortalidad, cifrado para algunas especies en el 100%; por lo que se deduce que es muy importante un diagnóstico rápido, además de la prescripción de un tratamiento específico que permita el uso racional de los antifúngicos, y con esto también, limitar la aparición de resistencias (Mayayo, 2004). Así mismo, el análisis de los hongos puede llevar al desarrollo de nuevos fármacos con actividad antifúngica específica. En la industria alimenticia, la presencia de hongos y sus metabolitos (por ejemplo *Aspergillus flavus*: aflatoxinas) en los diversos alimentos y granos en almacenamiento pueden traer como resultado pérdidas económicas considerables, aunado a esto, las enfermedades producidas por productos contaminados son el resultado directo de graves problemas en la salud. La mayoría de estos patógenos son capaces de crecer y desarrollarse en los alimentos, muchas de las veces sin producir cambios inmediatos en estos, como son olor, color o textura; por lo que el análisis mediante la identificación, monitoreo y cuantificación de los hongos y sus productos tóxicos es imprescindible (García y Cifuentes ,2007). Por otra parte, se ha incrementado el uso de los hongos en la obtención y elaboración de alimentos y bebidas, ejemplo de ello es *Penicillium roquefortii* en la elaboración de quesos y *Aspergillus oryzae* para la producción de bebidas alcohólicas. En la industria farmacéutica una amplia variedad de hongos filamentosos son usados para la producción de antibióticos, entre los que se encuentran las penicilinas, producidas por *Penicillium notatum* y las cefalosporinas, sintetizadas por cepas de *Cephalosporium acremonium* (Herrera y Ulloa, 1998).

El empleo de los hongos en la industria requiere de la identificación del organismo, un riguroso análisis de sus propiedades tanto superficiales como metabólicas, la determinación de su viabilidad y un total control microbiológico para evitar contaminación.

2.11 TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ANÁLISIS DE HONGOS

Los métodos usados tradicionalmente para el análisis fúngico son la microscopia y el cultivo, los cuales involucran la inoculación del microorganismo en un medio de cultivo, seguido de incubación para su crecimiento y desarrollo, por varios días o hasta semanas. Posteriormente este medio es examinado para observar la presencia del hongo en cuestión. Esta técnica es capaz de determinar la presencia del microorganismo, permite su observación microscópica y la realización de estudios metabólicos. Sin embargo, presenta la gran desventaja de llevarse a cabo en un largo periodo de tiempo, así como su incapacidad para identificar al hongo a nivel de especie. Se han hecho algunas variaciones a este método para compensar el tiempo que tarda en realizarse, sin embargo aún consume varios días para obtener resultados definitivos (Lantz *et al.*, 2007; Pontón, 2002). Por este motivo se han buscado nuevas técnicas que posean mayor rapidez y sensibilidad para el análisis, caracterización e identificación de células fúngicas. Estas técnicas incluyen, entre otras, pruebas serológicas, que permite la detección tanto de antígenos fúngicos como de la respuesta de anticuerpos que se producen durante el desarrollo de una infección y ELISA, con fines de diagnóstico. Por otro lado, técnicas como citometría de flujo, espectrometría de masas y de fluorescencia, análisis de proteínas y caracterización genotípica (PCR) se emplean principalmente en investigación (Simonet *et al.*, 2008). Muchos de estos procedimientos requieren la preparación de cultivos microbiológicos, con lo cual se prolonga drásticamente el tiempo de análisis. Por ejemplo, los protocolos de citometría de flujo requieren del cultivo antes del estudio con la finalidad de incrementar la sensibilidad (Desai y Armstrong, 2003). Las técnicas serológicas presentan una buena especificidad pero una baja sensibilidad, lo que dificulta la identificación, y se requiere de grandes concentraciones del hongo (Pontón, 2002). Por su gran especificidad, han aumentado el empleo de técnicas moleculares como la PCR para el estudio de los hongos a través de su material genético, lo que permite la diferenciación de hongos muy similares y la identificación de hongos poco conocidos; además, se obtienen excelentes resultados de forma rápida (Jackowski *et al.*, 2008; Pontón, 2002). Si bien, estas técnicas han sido de gran utilidad para el análisis de células fúngicas

que requieren de instrumentos complicados, gran consumo de reactivos y procedimientos complejos, por lo que en la mayoría de las ocasiones resultan ser técnicas muy costosas. Por esto es que en años recientes se han desarrollado técnicas electrocinéticas como es la Electroforesis Capilar (EC) para el estudio de analitos microbiológicos. La EC se ha convertido en una importante herramienta para la identificación y estudio de las características de los microorganismos gracias a sus propiedades como son, alto rendimiento, gasto mínimo de reactivo, bajo costo, eficacia, sensibilidad y sobre todo rapidez (Girod y Armstrong, 2002).

2.12 ELECTROFORESIS CAPILAR

La Electroforesis es en sus orígenes una técnica de separación basada en el fenómeno de la migración diferencial. Este fenómeno se describe como la velocidad que presentan partículas cargadas cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico (Valverde, 2002). El desplazamiento de sustancia bajo la acción de un campo eléctrico fue citado por primera vez en 1809 por *Reuss* en las memorias de la Sociedad Imperial Natural (Moscow, 1809; Castagnino, 1999). Sin embargo, su importancia vino a incrementarse hasta 1937 cuando el químico sueco *Arne Tiselius* impulsó la electroforesis en solución libre, nombre que asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte. En los años siguientes, con la publicación de la doble hélice de DNA (Watson y Crick, 1953), la electroforesis se convierte en una herramienta indispensable para el estudio tanto de material genético como de péptidos y proteínas. Para 1967, *Hjerten* inicia el empleo de capilares milimétricos (3 mm) en la separación de sustancias neutras o iones cargados eléctricamente. Además, *Evereast* y cols., en 1968, inician la medición de la absorción UV a través del capilar, lo que permitió obtener los espectros característicos de la separación. En 1969, *Virtanen* pudo reducir el diámetro capilar a 200 y 500 μm , eliminando con esto, los problemas de convección. En la década de los 80's, *Mikkers* y cols., y *Jorgeson* y *Lukacs*, obtuvieron capilares de sílice fundida de 75 μm y utilizaron voltajes elevados para la separación de proteínas; además, se estudian las relaciones entre los parámetros operacionales y las cualidades de la separación revelando el elevado potencial analítico de esta técnica. Con esto, se presenta el lanzamiento de la Electroforesis Capilar (EC) (Castagnino, 1999; Oda y Landers, 1997).

La Electroforesis Capilar es una técnica de separación que se basa en la movilidad o velocidad de migración de partículas cargadas debido a la acción de un campo

eléctrico. Permite la separación rápida y eficiente de compuestos con carga iónica, ideal para manipular cantidades pequeñas de muestra. Emplea tubos capilares donde se lleva a cabo una separación de alta eficiencia, ya sea de moléculas grandes o pequeñas (Jackowski *et al.*, 2008; Armstrong *et al.*, 2001; Van der Mei y Busscher, 2001). La separación de las diferentes especies iónicas se realiza en función de sus distintas movilidades electroforéticas dentro del capilar, cuando se aplica una diferencia de potencial entre los extremos del mismo. La detección se realiza mediante la lectura de la absorbancia en la región del ultravioleta-visible, empleando lámparas de emisión discreta. La EC es fácilmente automatizada, es precisa para el análisis cualitativo y cuantitativo, consume cantidades limitadas de reactivos, por lo que resulta ser una técnica económica; es aplicable a una amplia gama de analitos, comparado con otras técnicas de separación analítica; además, posee facilidad de empleo (Palenzuela *et al.*, 2004).

Existen varios tipos de electroforesis capilar: electroforesis capilar de zona (CZE), enfoque isoeléctrico capilar (CIEF), electroforesis capilar en gel (CGE), isotacoforesis capilar (CITP), electrocromatografía capilar (ECC) y cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC). Particularmente, la CZE es por mucho la más utilizada como modo de separación, debido a la simplicidad de operación y versatilidad; es la forma más simple de EC, la composición del buffer es constante en toda la zona de separación; el potencial aplicado hace que los diferentes componentes iónicos de la muestra migren cada uno según su propia movilidad y se separen en zonas que pueden estar completamente resueltas o parcialmente solapadas; entre las zonas completamente resueltas hay huecos ocupados por el buffer; la separación de analitos catiónicos y aniónicos es posible debido a la influencia del flujo electroosmótico (FEO). Se pueden separar y analizar por CZE una gran variedad de moléculas de pequeño tamaño, tales como herbicidas sintéticos, pesticidas y fármacos, siempre que sean moléculas cargadas o puedan derivatizarse para dar un ión; proteínas, aminoácidos y carbohidratos se han separado en tiempos mínimos por CZE (Skoog *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2005).

2.13 COMPONENTES DE UN SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR

La configuración instrumental básica de la EC es relativamente sencilla. Se requiere de un capilar de sílice fundida de diámetro interno menor a 200 μm recubierto externamente con una película de poliamida para protegerlo de daños mecánicos, el cual posee una ventana visible o celda de detección, en éste se lleva a cabo la

separación electroforética; una fuente de alto voltaje que proporciona de 0 a 30 KV (el empleo de campos eléctricos muy elevados permite reducir drásticamente el tiempo de análisis); un sistema refrigerante del capilar y un sistema inyector de muestra; dos electrodos de platino uno que funcionará como cátodo y otro como ánodo conectados a la fuente de voltaje, dos recipientes para el buffer donde puedan introducirse tanto los extremos del capilar como los extremos de los electrodos; un cassette que en su interior contiene el capilar prealineado con un lente de microenfocado para obtener una detección más sensible y estable, es hermético y en su interior se hace circular un líquido refrigerante para evitar la formación de gradientes térmicos que provoquen distorsiones; un detector que pueda ser de luz UV o de fluorescencia, donde es alineada la celda de detección del capilar y un sistema de administración de datos (Castagnino, 2000; Skoog *et al.*, 2001) [Fig. 6]

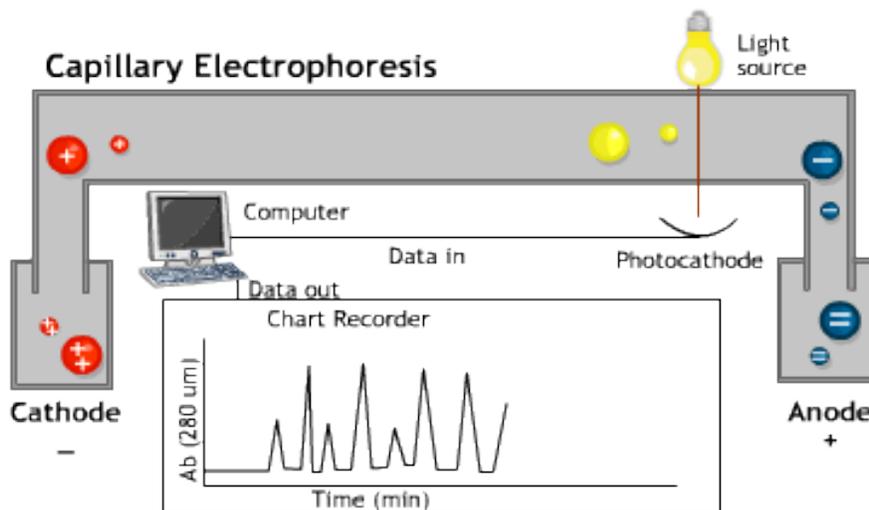


Fig 2. Componentes básicos del equipo de Electroforesis Capilar. (Heiger, 2000)

El capilar se rellena con un electrolito con capacidad amortiguadora al pH deseado. La muestra que se encuentra constituida por un conjunto de aniones (+) y cationes (-), se diluye en el buffer para ser introducida en el capilar, ya sea mediante vacío o presión, para posteriormente aplicar el voltaje; entonces las especies iónicas de la muestra migran a través del capilar de acuerdo a su movilidad electroforética, estableciendo un movimiento de iones. Los cationes migran hacia el cátodo y los aniones hacia el ánodo, las especies neutras no migran. Eventualmente las moléculas pasan por el detector (UV, LIF) donde se realiza la lectura de la

absorbancia en la región del UV-Vis. Posteriormente se registra la señal en el sistema de administración de datos.

2.14 CARACTERÍSTICAS DEL BUFFER DE CORRIMIENTO

Los reactivos que se pueden utilizar incluyen una amplia variedad de sistemas amortiguadores o buffer y aditivos que pueden ser usados para las separaciones; la mayoría de ellos son sustancias no tóxicas como fosfatos, borato, tris, etc.; además se utilizan HCl, H₂PO₄, y NaOH, agua destilada y metanol para la limpieza del capilar. El buffer determina y estabiliza el pH del medio de soporte, afecta a la movilidad electroforética por sus propiedades fisicoquímicas que son viscosidad, fuerza iónica, pH y constante dieléctrica; una elevada fuerza iónica del buffer incrementa la intensidad global de corriente que produce una disminución en FEO, además se produce calor, la selección de la fuerza iónica es muy importante, generalmente se elige dentro del intervalo de 0.05-0.10 M; el pH determina el grado de ionización sistema de EC, a mayor pH es mayor el FEO. Existe un fenómeno de adsorción que ocasiona una acumulación de moléculas de la muestra en la pared interna del capilar, originando señales indeseables y poco reproducibles, para esto es importante el empleo de aditivos que eviten la adsorción, así como la eliminación del FEO, además los aditivos cambian la selectividad de la separación y modifican la μ_{ep} (Skoog *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2005; Cázares, 2007).

2.15 ORDEN DE MIGRACIÓN DE ANALITOS

La velocidad de migración está dada por la relación carga/masa de los analitos, este valor es directamente proporcional a la velocidad de migración del analito; en base a esto, primeramente migran analitos con una mayor relación carga/masa; para analitos del mismo tamaño, el de mayor carga eléctrica migrará más rápidamente; los analitos con relación carga/masa similar pero con diferentes formas, en la Fig. 7 se muestra el orden de migración al aplicar un voltaje positivo, en donde se aprecia que el FEO es constante para todos los analitos y lo que varía es la μ_{ep} , la sumatoria de ambos vectores origina a la μ_{ap} (Skoog *et al.*, 2001).

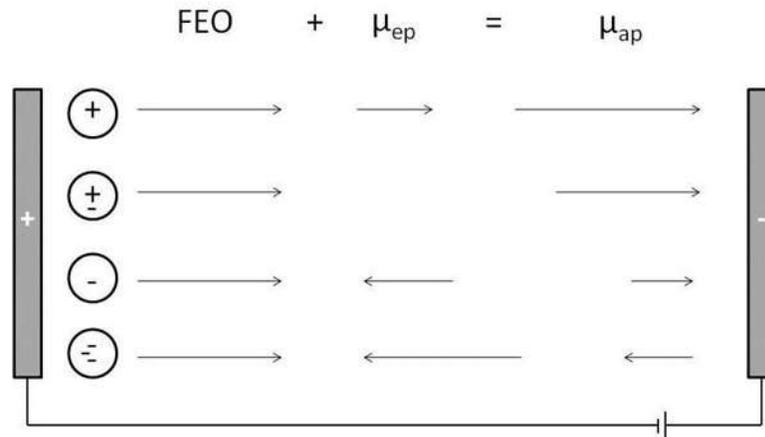


Fig 7. Orden de migración de analitos. www.imagenesgoogle.com

2.16 APLICACIONES GENERALES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

El avance de la EC ha ido incrementando a pasos agigantados y prueba de ello es el desarrollo de nuevos métodos y aplicaciones a una amplia variedad de problemas analíticos. Se ha extendido al área biomédica, en el campo de las proteínas, ADN, líquidos corporales, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, sustancias xenobióticas, de abuso y peritajes forenses. En el área biofarmacéutica para control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos. En alimentos ha sido de enorme utilidad en la determinación de contaminantes, cuantificación de carbohidratos, aminoácidos y ácidos orgánicos así como en control ambiental mediante la identificación de contaminantes y sus metabolitos en aguas residuales. Aplicaciones recientes de la EC es el análisis de entidades biológicas, lo que está permitiendo desarrollar un nuevo método para el estudio y caracterización tanto de células como de microorganismos (Castagnino, 2000; Cázares, 2009; Chen, 1991).

III. JUSTIFICACIÓN

Los hongos, son una herramienta importante en la biotecnología debido a sus múltiples usos en la industria alimentaria, farmacéutica, agrícola y biomédica. Algunos hongos filamentosos son responsables de ocasionar infecciones y alergias, contaminación en alimentos y enfermedades en plantas; otros hongos filamentosos son de interés a nivel industrial, en agricultura, en biorremediación y a nivel de investigación sobre ecología; uno de estos hongos de importancia es *Trichoderma*, muy usado como modelo de estudio de hongos filamentosos en trabajos multidisciplinarios y muy valorado en la industria por la obtención de diferentes enzimas y metabolitos secundarios. Conocer sus requerimientos nutricionales y las condiciones ambientales que afectan su desarrollo es de gran trascendencia ya que debido a la importancia que tienen las esporas fúngicas como elementos de diseminación y clasificación de los diferentes géneros y especies, es imprescindible su estudio. Los hongos conidian/esporulan lento en condiciones ambientales idóneas a razón de su buena adaptación, es por ello que en este estudio se evaluaron diferentes fuentes nutritivas de Carbono y Nitrógeno para obtener una condición ideal para lograr una conidiación en menor tiempo y emplear las conidias para su pronto análisis en métodos de diagnóstico. Al usar Electroforesis Capilar, se pueden investigar sus propiedades con el fin de obtener información de la forma en que se comportan e interactúan con el medio que las rodea. Ello proporcionaría información sobre la composición celular de conidias, adhesión a diferentes superficies o su aglutinación y los cambios que se dan en estas al variar condiciones del medio en el que crecen. Este tipo de estudio sentaría las bases para emplear la EC como herramienta de diagnóstico. Por otro lado permitiría conocer mejor las propiedades de los diversos hongos y con esto, incrementar su utilidad en el área biotecnológica.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Encontrar condiciones de rápida conidiación de una cepa de *Trichoderma atroviride* de referencia y establecer si se afectan las propiedades de superficie.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer la velocidad de crecimiento y el tiempo de conidiación de *Trichoderma atroviride* 206040 como consecuencia de adicionar diferentes fuentes de carbono, de nitrógeno y modificar el pH del medio de cultivo.
- Evaluar el efecto combinado que tienen las condiciones de rápida conidiación encontradas en el punto anterior sobre la velocidad de crecimiento de cuatro cepas silvestres de *Trichoderma*.
- Determinar si las diferentes condiciones de crecimiento tienen algún efecto sobre la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma atroviride* 206040.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 REACTIVOS

Todos los reactivos empleados son de grado analítico.

Tabla 2. REACTIVOS

REACTIVO	NOMBRE	MARCA	GRADO
CH ₂ OH(CHOH) ₄ CHO	D-GLUCOSA ANHIDRA	Técnica Química, S.A.	ACS
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ •H ₂ O	MALTOSE MONOHYDRATE	SIGMA-ALDRICH CO.P.O.	ACS
CO(NH ₂) ₂	UREA	Invitrogen life technologies	ACS
C ₅ H ₁₀ O ₅	D (+) XYLOSE	SIGMA CHEMICAL CO.P.O.	ACS
C ₆ H ₁₀ O ₅	STARCH, soluble de papa(ALMIDON DE PAPA)	SIGMA CHEMICAL CO.P.O.	ACS
CH ₃ CH(NH ₂)COOH	DL-ALANINA	HYCEL DE MEXICO, S.A. DE C.V.	ACS
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ •H ₂ O	LACTOSA MONOHIDRATADA	REACTIVOS QUIMICA MEYER [®]	ACS
C ₃ H ₇ NO ₂ S	L-CYSTEINA	SIGMA-ALDRICH CO.P.O.	ACS
NaNO ₂	NITRITO DE SODIO	REACTIVOS QUIMICA MEYER [®]	ACS
NaNO ₃	NITRATO DE SODIO	REACTIVOS QUIMICA MEYER [®]	ACS
C ₆ H ₁₄ O ₆	DEXTROSA	DIBILO [®] S.A. DE C.V.	ACS
C ₆ H ₁₂ O ₆	D-FRUCTUOSA	REACTIVOS QUIMICA MEYER [®]	ACS
HCl	ACIDO CLORHIDRICO	REACTIVO BAKER [®]	ACS
NaOH	HIDROXIDO DE SODIO	REACTIVO JT BAKER [®]	ACS
C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	HEPES	SIGMA-ALDRICH CO.P.O.	ACS
C ₁₉ H ₄₂ BrN	HEXADECYLTRIMETHYL-AMMONIUM BROMIDE (CTAB)	SIGMA-ALDRICH CO.P.O.	ACS
VOGEL	MEDIO DE CULTIVO VOGEL		
H ₂ O	AGUA DESTILADA		
H ₂ O	AGUA INYECTABLE ESTERIL	PISA [®]	

Tabla 3. REACTIVOS FUENTES DE CARBONO

REACTIVO	NOMBRE	MARCA	GRADO
CH ₂ OH(CHOH) ₄ CHO	D-GLUCOSA ANHIDRA	Técnica Química, S.A.	ACS
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ •H ₂ O	MALTOSE MONOHYDRATE	SIGMA-ALDRICH CO.P.O.	ACS
C ₅ H ₁₀ O ₅	D (+) XYLOSE	SIGMA CHEMICAL CO.P.O.	ACS
C ₆ H ₁₀ O ₅	STARCH, soluble from potato (ALMIDON DE PAPA)	SIGMA CHEMICAL CO.P.O.	ACS
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ •H ₂ O	LACTOSA MONOHIDRATADA	REACTIVOS QUIMICA MEYER [®]	ACS
C ₆ H ₁₄ O ₆	DEXTROSA	DIBILO [®] S.A. DE C.V.	ACS
C ₆ H ₁₂ O ₆	D-FRUCTUOSA	REACTIVOS QUIMICA MEYER [®]	ACS

Tabla 4. REACTIVOS FUENTES DE NITRÓGENO

REACTIVO	NOMBRE	MARCA	GRADO
CO(NH ₂) ₂	UREA	Invitrogen life technologies	ACS
C ₃ H ₇ NO ₂ S	L-CYSTEINE	SIGMA-ALDRICH CO.P.O.	ACS
NaNO ₂	NITRITO DE SODIO	REACTIVOS QUIMICA MEYER [®]	ACS
NaNO ₃	NITRATO DE SODIO	REACTIVOS QUIMICA MEYER [®]	ACS
CH ₃ CH(NH ₂)COOH	DL-ALANINA	HYCEL DE MEXICO, S.A. DE C.V.	ACS

5.2 MEDIOS DE CULTIVO

5.2.1 AGAR VOGEL

Se resuspenden 1.5 g de polvo agar, 1.5 g de la fuente de carbono (dextrosa) pesados en balanza analítica (SARTORIUS CP1245), se agregan 2 mL de Stock de Vogel compuesto por vitaminas y minerales traza en 100mL de agua destilada. Se mezcla perfectamente con agitación frecuente hasta disolución completa. Se coloca en matraces Erlenmeyer y se esteriliza en autoclave (PRESTO[®]) a 121° C por 15 minutos. Posteriormente se deja enfriar y se vacía en placas Petri. Las placas se conservan en refrigeración hasta su uso.

5.2.2 MEDIO MÍNIMO VOGEL MODIFICADO PARA FUENTES DE CARBONO

Se resuspenden 1.5 g de polvo agar, 1.5 g de la fuente de carbono empleadas (dextrosa, glucosa, maltosa, fructuosa, lactosa, almidón de papa, xilosa) pesados en balanza analítica (SARTORIUS CP1245), se agregan 2 mL de Stock de Vogel compuesto por vitaminas y minerales traza en 100mL de agua destilada. Se utiliza HCl y NaOH diluidos para hacer cambios en el pH en (Potenciometro Hanna bench pH Meter SP-PH211), de acuerdo al pH a trabajar (5, sin modificar, 7, 8). Se mezcla perfectamente con agitación frecuente hasta disolución completa. Se coloca en matraces Erlenmeyer y se esteriliza en autoclave (PRESTO[®]) a 121° C por 15 minutos. Posteriormente se deja enfriar y se vacía en placas Petri. Las placas se conservan en refrigeración hasta su uso.

5.2.3 MEDIO MÍNIMO VOGEL MODIFICADO PARA FUENTES DE NITRÓGENO

Se resuspenden 1.5 g de polvo agar, 1.5 g de dextrosa pesados en balanza analítica (SARTORIUS CP1245), se agregan 2 mL de Stock de Vogel modificado en la parte de la fuente nitrógeno por 5 diferentes (urea, alanina, cisteína, nitrito y nitrato de sodio) compuesto por vitaminas y minerales traza en 100mL de agua destilada. Utilizamos HCl y NaOH diluidos para hacer cambios en el pH en (Potenciometro Hanna bench pH Meter SP-PH211) de acuerdo al pH a trabajar (5, sin modificar, 7,

8). Se mezcla perfectamente con agitación frecuente hasta disolución completa. Se coloca en matraces Erlenmeyer y se esteriliza en autoclave (PRESTO[®]) a 121° C por 15 minutos. Posteriormente se deja enfriar y se vacía en placas Petri. Las placas se conservan en refrigeración hasta su uso.

5.3 CULTIVO

Cada placa se inocula con un bocado (cilindro de 0.5 cm de diámetro) de micelio fresco obtenido de un precultivo realizado en medio mínimo VOGEL.

5.4 CEPA ESTUDIADA

Tabla 5. CEPA ESTUDIADA Y CONDICIONES DE CULTIVO

HONGO	FILO	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA
<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040*	Ascomycota	MEDIO DE CULTIVO VOGEL	28° C / Ambiente

*Cepa obtenida comercialmente de un centro de referencia.

5.5 CRECIMIENTO EN EL MEDIO IDEAL

Bajo las condiciones encontradas, se determinó la velocidad de crecimiento de las siguientes cepas silvestres:

- *Trichoderma tomentosum* CMU-221
- *Hypocrea lixii* / *Trichoderma harzianum* CMU-1
- *Hypocrea rufa* / *Trichoderma viride* CMU-218
- *Hypocrea atroviridis* / *Trichoderma atroviride* CMU-8

5.6 MORFOLOGÍA Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO

La cepa fue subcultivada en agar Vogel con sus diferentes modificaciones en pH, fuente de carbono y nitrógeno, por duplicado en Campana de Bioseguridad Nivel I, se incubaron a 28° C en incubadora (LAB-LINE ENVORONETTE, LAB-LINE INSTRUMENTS INC.), y se realizaron mediciones del diámetro de la colonia en cm con ayuda de un Vernier cada 6 horas, también se registró el tiempo en el que aparecieron las conidias.

5.7 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

El análisis microscópico de las esporas fúngicas se realiza con un microscopio (LEICA DM750) con cámara integrada en un objetivo de 40 X esto para obtener un mayor detalle de la superficie de las esporas.

5.8 EQUIPO Y ACONDICIONAMIENTO DE CAPILAR

Para los corrimientos electroforéticos se utilizó un equipo (P/ ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System *Beckman Coulter*®), para el análisis electroforético de conidias, con un capilar de sílice fundida de 100 µm de d.i., 50 cm de L_t y 40 cm de L_d, detector de arreglo de diodos y un detector óptico de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda (λ) de 201 nm, el voltaje utilizado fue de (-)17 kilovolts (KV), la temperatura dentro del equipo es controlada de 25° C, antes de comenzar diariamente con el análisis electroforético se realizó un acondicionamiento del capilar.

Tabla 6. ACONDICIONAMIENTO INICIAL DEL CAPILAR		
t (min)	Solución	Presión (psi)
2	H ₂ O destilada	20
10	NaOH 1M	20
5	Buffer de corrimiento	20

El método utilizado para los corrimientos electroforéticos se describe a continuación:

Tabla 7.MÉTODO UTILIZADO PARA LOS CORRIMIENTOS ELECTROFORÉTICOS			
t (min)	Solución	Presión (psi)	Voltaje
3	Buffer de corrimiento	20	-
0.12	Muestra	0.035	-
15	Buffer de separación	-	-17 kV

Al finalizar cada jornada de trabajo se realizó un lavado final del capilar.

Tabla 8.LAVADO FINAL DEL CAPILAR		
t (min)	Solución	Presión (psi)
2	NaOH 1M	20
2	H ₂ O destilada	20
2	Aire	20

5.9 OBTENCION DE CONIDIAS

Para los corrimientos electroforéticos se usaran únicamente las conidias, para obtenerlas es necesario tener cuidado de eliminar el micelio pues este ocasionara falsas señales.

Obtención de conidias: se adicionan 3 mL de agua inyectable estéril (PiSA®) al cultivo, se mueve la placa ladeándola en diferentes direcciones para que con el

EFEECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

movimiento del agua se desprendan los cuerpos fructíferos donde están contenidas las conidias; posteriormente, se recuperan con una pipeta Pasteur y la suspensión se coloca en tubo Eppendorf de 1.5 mL; se centrifuga a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) o 13,300 fuerza centrífuga relativa (rcf / fuerza G) durante 10 minutos, se decanta el sobrenadante y se vuelven a resuspender en agua destilada estéril, se repite este proceso 2 veces de tal forma que las conidios reciban 3 lavados.

Teniendo ya las conidias en tubos Eppendorf con agua destilada estéril, se resuspenden agitando en Vortex (IKA MS1 Minishaker®) durante 2 minutos; posteriormente, se toman 400 μ L de la suspensión que se mezclan con 200 μ L de buffer de corrimiento y se colocan en un vial especial para el equipo de EC y se colocó en un Sonicador (Branson 1510) durante 10 minutos para eliminar microburbujas y agregados de conidias presentes en la muestra.

5.10 CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO

- 1.- Se preparan soluciones de NaOH 1N y HCl 1M para ajustar el pH de buffers y realizar el lavado del capilar.
- 2.- Se preparan los buffers a usar de acuerdo con la tabla 9.
- 3.- Se sonicar (BRANSON 1510) durante 10 minutos para eliminar micro burbujas que generen señales electroforéticas indeseables.
- 4.- Se realiza el lavado del capilar mediante una técnica previamente establecida.
- 5.- Se procede a realizar el corrimiento electroforético usando como buffer HEPES, con las condiciones escritas en la tabla 7.

Tabla 9. PREPARACIÓN DE BUFFER Y SURFACTANTE		
Buffer	Concentración	pH
HEPES	10 mM	7.0
Surfactante	Concentración	
HEXADECYLTRIMETHYL-AMMONIUM BROMIDE (CTAB)	1 %	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MORFOLOGÍA Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO INCUBACIÓN A 28 °C

La cepa utilizada *T. atriviride* IMI-206040 presentó una morfología tanto macroscópica como microscópica muy parecida entre sí en sus diferentes modificaciones en fuente de carbono, fuente de nitrógeno, pH, la velocidad de crecimiento, tiempo y forma de conidiación; en general presentaron un micelio algodonoso blanco, con conidiación color verde intenso, verde-amarillento y café, de acuerdo con Butler y Day (1998), esto se debió a diferentes concentraciones de melanina en la pared celular, no se observó pigmento en el medio de cultivo; al microscopio se observaron hifas septadas y hialinas; particularmente manifestó conidiación a manera de anillos concéntricos, los anillos de conidiación centrales fueron de una tonalidad verde, mientras que los anillos más externos denotaron coloración verde amarillento, al microscopio se observaron conidióforos alargados y con muchas ramificaciones, fiálides cortas y conidias esféricas de color verde, verde amarillentas y verdes-café. Ver anexo III.

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante, comienzo de la conidiación) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por los mismos microorganismos, pero supóngase por ahora que éste no es el caso y que la primera alternativa es la válida. Luego hay dos aspectos claramente diferenciables que hacen al crecimiento microbiano: uno estequiométrico, por el cual la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y el otro cinético, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso (Ertola *et al.*, 2003).

En base a los resultados obtenidos y a las observaciones realizadas sobre las cinéticas de crecimiento y tiempos de conidiación, las fuentes nutritivas en las cuales *Trichoderma atroviride* IMI-206040 mostró un mayor y mejor desarrollo fueron, Fructuosa, como fuente de carbono, y Alanina, como fuente de nitrógeno,

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

en las cuatro variantes de pH, incubada a 28°C. El comportamiento sobre la velocidad de crecimiento, conidiación en función del pH fue la siguiente:

$$\text{pH 5} = \text{pH sin modificar (5.90)} > \text{pH 7} > \text{pH 8},$$

El bajo pH parece ser un factor determinante para la formación de conidias en esta especie de *Trichoderma* (Steyaert *et al.*, 2010b). Los hongos tienen un intervalo amplio de pH que oscila entre 4 y 8 en el cual pueden crecer; pero el pH óptimo para la mayoría de ellos se encuentra por debajo de 7, entre 4 y 6. Fuera de este intervalo, se podría alterar la actividad de las enzimas implicadas en los procesos metabólicos y la producción de sustancias importantes (Moore, 1996).

En este estudio se pudo apreciar que el tiempo de conidiación varió de una fuente de nutriente a otra y de un pH a otro; se pudo comprobar que *Trichoderma atroviride* IMI-206040 tiende a conidiar entre las 72 y 120 h ya que es una especie que en la naturaleza presentan un estado asexual, esto les permite adaptarse rápidamente a condiciones tanto ambientales como de laboratorio.

Tabla 10. CINÉTICA DE CRECIMIENTO *Trichoderma spp.* a pH 5

		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (días ⁻¹)	TIEMPO DE CONIDIACION (h) a 28 °C
FUENTES DE CARBONO	FRUCTUOSA	0.01709004	72
	LACTOSA	0.01068601	96
	XILOSA	0.01716223	96
	GLUCOSA	0.02088054	96
	DEXTROSA	0.0209394	96
	MALTOSA	0.02092511	96
	ALBUMINA	0.02070807	72
FUENTES DE NITROGENO	ALANINA	0.01697715	72
	UREA	0.01254777	96
	CISTEINA	0.01599835	96
	NITRITO	0.01108235	96
	NITRATO	0.0148928	96

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

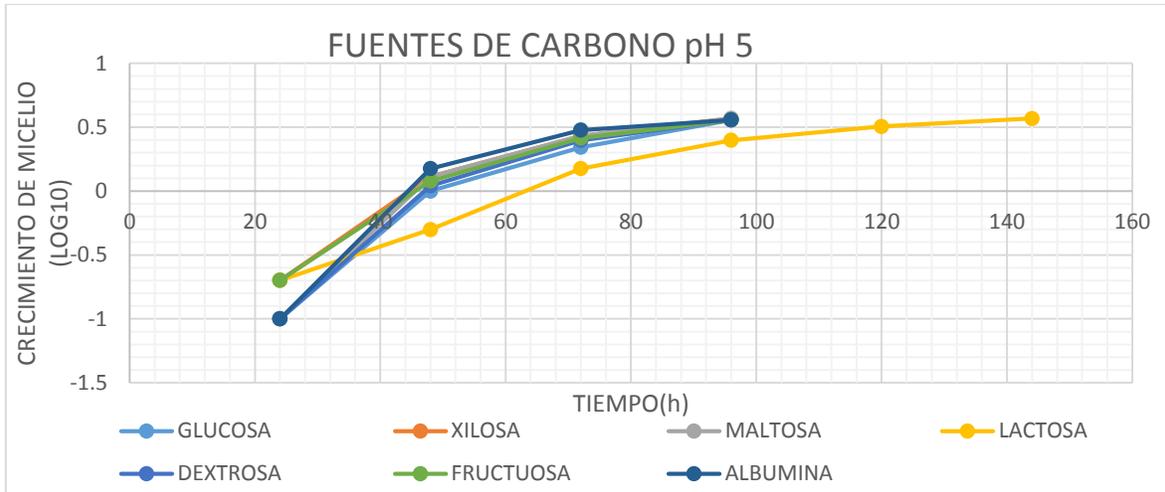


Fig 8. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH 5 con incubación a 28 °C.

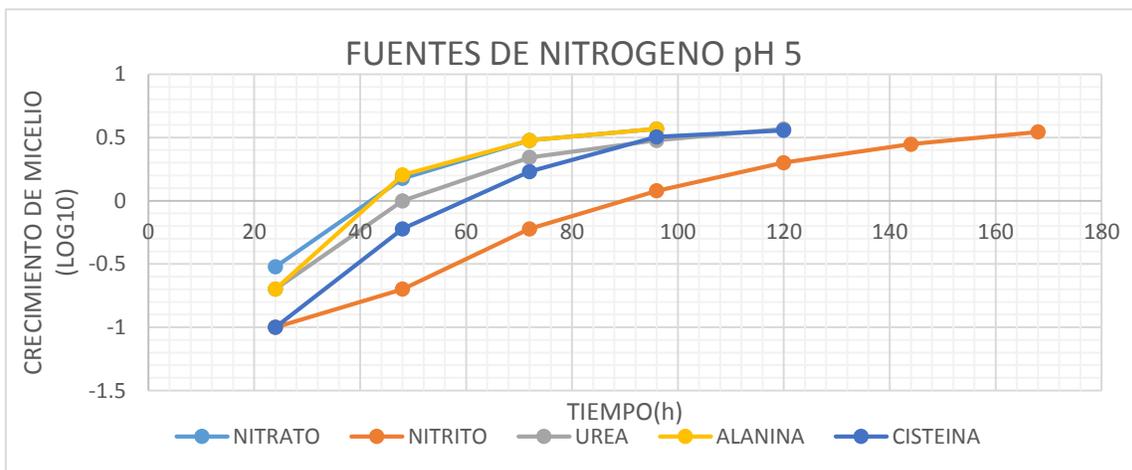


Fig 9. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH 5 con incubación a 28 °C.

Se pudo apreciar que los tiempos de conidiación fueron muy diferentes entre cada una de las distintas fuentes nutritivas empleadas a diversos valores de pH. A pH 5, algunas fuentes de carbono y nitrógeno presentaron más tempranamente conidiación; a las 72 h fructuosa, albumina y alanina, a las 96 h lactosa, xilosa, glucosa, maltosa, dextrosa, urea, cisteína, nitrato y nitrito.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

Su crecimiento comenzó con micelio aéreo blanco algodonoso, todas ellas manifestaron conidiación a manera de anillos concéntricos, los anillos de conidiación centrales fueron de una tonalidad verde, mientras que los anillos más externos denotaron coloración verde amarillento, no tiñeron el medio de color. Peculiarmente en este pH en el tiempo que está definida la conidiación [Tabla 10, Figuras 8, 9] conforme iba creciendo el hongo este conidiaba y así sucesivamente hasta cubrir en su totalidad la placa. No fue necesario hacer daño mecánico en el micelio para inducir conidiación.

Tabla 11. CINÉTICA DE CRECIMIENTO <i>Trichoderma spp.</i> a pH sin modificar (5.90)			
		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (días⁻¹)	TIEMPO DE CONIDIACION (h) a 28 °C
MEDIO MINIMO VOGEL		0.01278776	72
FUENTES DE CARBONO	FRUCTUOSA	0.01663481	48
	LACTOSA	0.01272024	48
	XILOSA	0.01292292	96
	GLUCOSA	0.01663481	48
	DEXTROSA	0.01702564	48
	MALTOSA	0.01282671	48
	ALBUMINA	0.01701907	48
FUENTES DE NITROGENO	ALANINA	0.01476795	48
	UREA	0.01325619	96
	CISTEINA	0.01711767	96
	NITRITO	0.01254978	96
	NITRATO	0.01266456	96

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

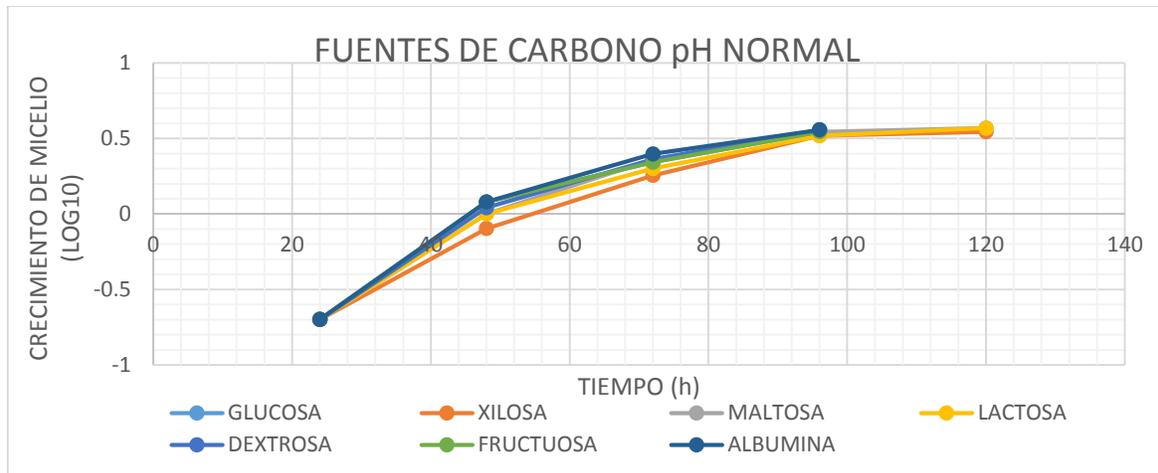


Fig 10. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH normal con incubación a 28 °C.

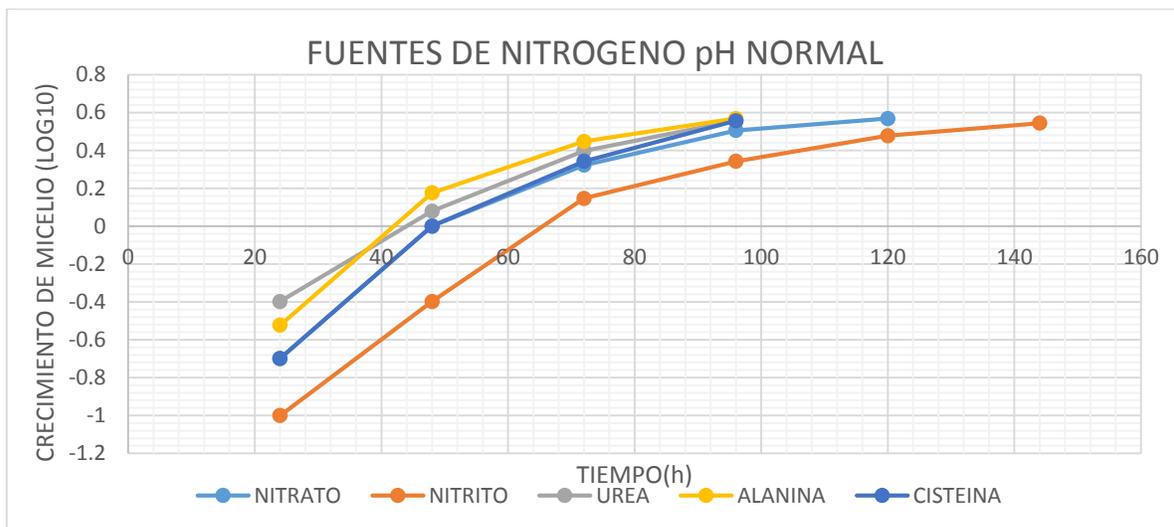


Fig 11. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Nitrógeno a pH normal con incubación a 28 °C.

Por otra parte, a pH sin modificar (5.90) se realizó el mismo ensayo con las diferentes fuentes a las mismas condiciones y estas arrojaron los siguientes resultados: a las 48h presentaron conidiación fructuosa, lactosa, glucosa, dextrosa, maltosa, albumina, alanina. Se hizo crecer en medio mínimo Vogel en el cual conidio a las 74h. Xilosa, urea, cisteína, nitrito y nitrato conidieron a las 96 horas, todas mostraron el mismo comportamiento de crecimiento con aros concéntricos formados de micelio blanco algodonoso, las conidias verdes y verde amarillento con mayor intensidad del centro de la placa hacia las orillas [Tabla 11, Figuras 10, 11].

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

Tabla 12. CINETICA DE CRECIMIENTO <i>Trichoderma spp.</i> a pH 7			
		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (días ⁻¹)	TIEMPO DE CONIDIACION (h) a 28 °C
FUENTES DE CARBONO	FRUCTUOSA	0.01556	72
	LACTOSA	0.00979895	72
	XILOSA	0.01527091	120
	GLUCOSA	0.01531837	120
	DEXTROSA	0.01577961	120
	MALTOSA	0.01148223	72
	ALBUMINA	0.01041183	96
FUENTES DE NITROGENO	ALANINA	0.01275605	72
	UREA	0.01537582	216
	CISTEINA	0.01286723	216
	NITRITO	0.01032061	216
	NITRATO	0.00969943	96

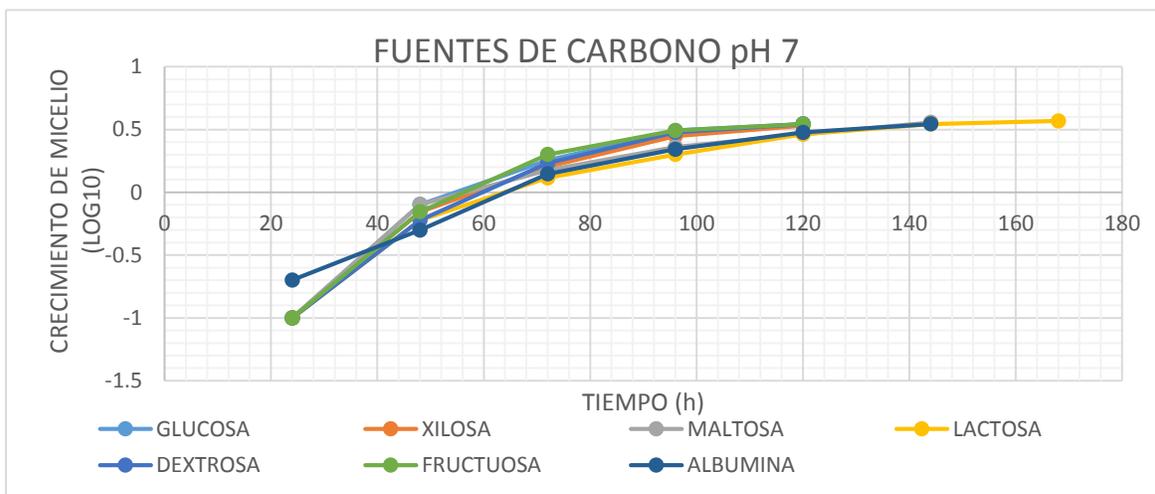


Fig 12. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH 7 con incubación a 28 °C.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

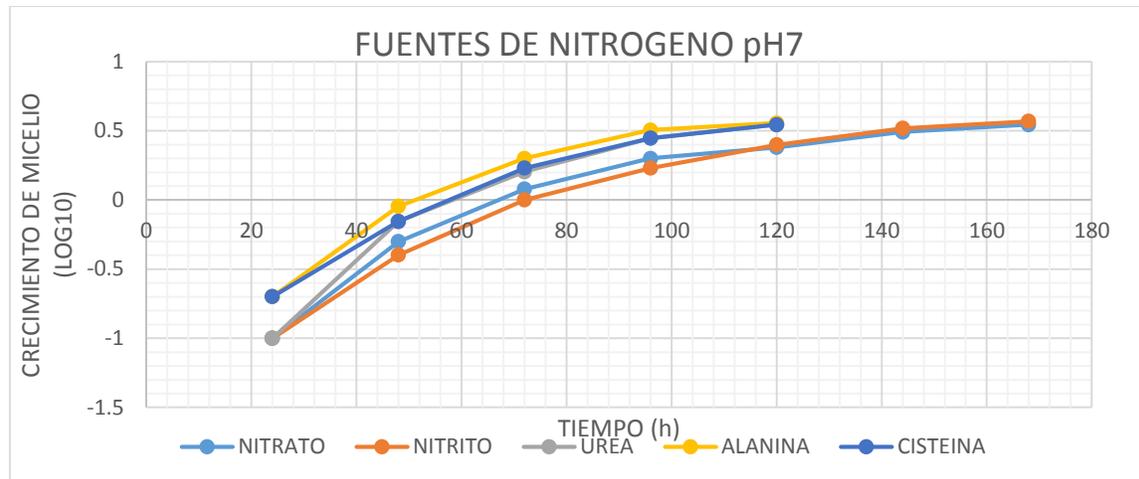


Fig 13. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Nitrógeno a pH 7 con incubación a 28 °C.

Se llevó a cabo el experimento también a pH 7 observándose pronta conidiación a las 72 h de fructuosa, lactosa y maltosa por el lado de las fuentes de carbono y por las fuentes de nitrógeno a este mismo tiempo fue la alanina, albumina y nitrato a las 96 h de cultivo a 28 °C. Xilosa, fructosa y glucosa a las 120 h, las que demoraron más tiempo en conidiar fueron urea, cisteína y nitrito a las 216 h de incubación. El crecimiento de todas las placas comenzó con la formación de micelio aéreo blanco algodonoso seguido de la aparición de aros concéntricos construidos de colonias elevadas de micelio antes descrito para dar paso a la formación de conidias ovaladas de color verde, verde amarillentas y de color café. Debido a la variación de pH al momento de la preparación del medio este se tornó de color amarillo obscuro [Tabla 12, figuras 12, 13].

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

Tabla 13. CINETICA DE CRECIMIENTO <i>Trichoderma spp.</i> a pH 8			
		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (días ⁻¹)	TIEMPO DE CONIDIACION (h) a 28 °C
FUENTES DE CARBONO	FRUCTUOSA	0.00849943	192
	LACTOSA	0.00454298	216
	XILOSA	0.01045865	216
	GLUCOSA	0.00885166	240
	DEXTROSA	0.0099408	240
	MALTOSA	0.00424632	240
	ALBUMINA	0.00745902	240
FUENTES DE NITROGENO	ALANINA	0.01201214	192
	UREA	0.00777185	240
	CISTEINA	0.00988783	240
	NITRITO	0.00527618	264
	NITRATO	0.00210566	264

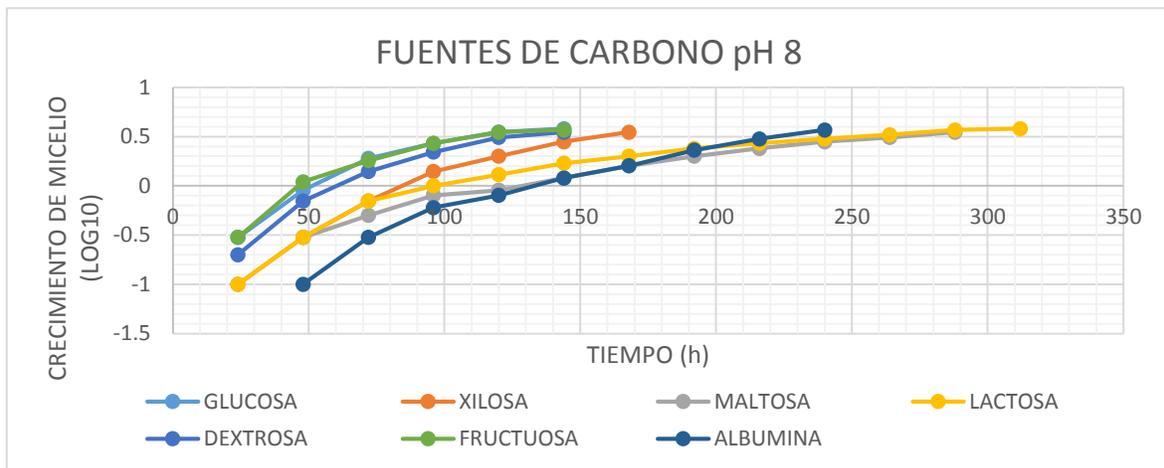


Fig 14. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono a pH 8 con incubación a 28 °C.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

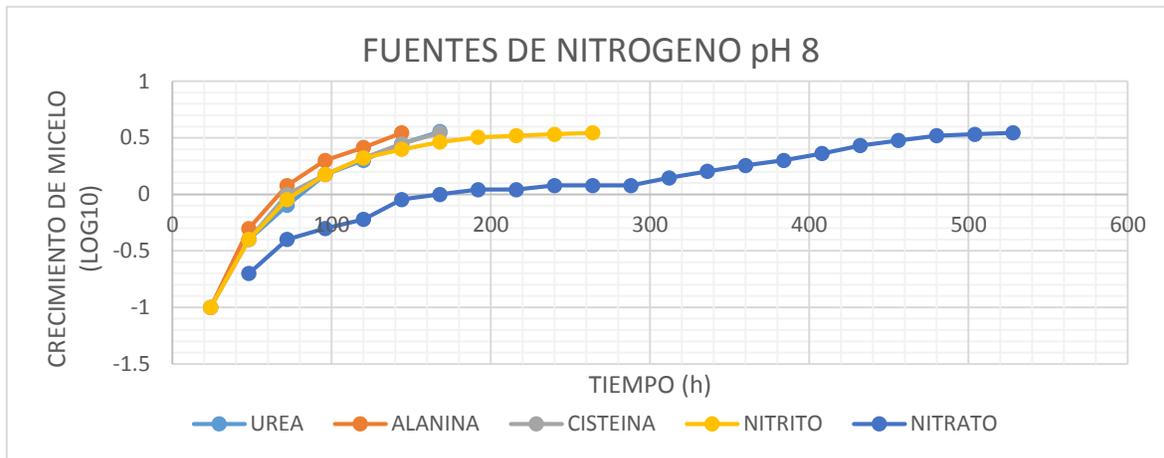


Fig 15. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Nitrógeno a pH 8 con incubación a 28 °C.

Finalmente, se realizó el mismo experimento pero a pH 8 nos arrojó el siguiente patrón de conidiación: en primer lugar está la fructuosa y la alanina con un tiempo de 192 h, seguido de lactosa y xilosa a las 216 h, a las 240 h esta la glucosa, dextrosa, maltosa y la albumina por el lado de las fuentes de carbono y las de nitrógeno fueron urea y cisteína. Por ultimo a las 264 h están las fuentes de nitrógeno inorgánicas nitrito y nitrato donde las conidias se observan de una coloración verde-café. Todas forman inicialmente micelio aéreo blanco algodonoso y posteriormente la aparición de anillos concéntricos elevados que dan lugar a la conidiación vistas de color verde, verde amarillento y café en algunos casos. En la preparación del medio este mostro una coloración amarilla casi ámbar [Tabla 13, Figuras 14, 15].

Las fuentes de carbono en las que se observó mayor velocidad de crecimiento fueron en el siguiente orden:

Fructosa > Glucosa = Dextrosa > Albumina > Maltosa > Xilosa > Lactosa,

Según Pérez y Ramírez (2000) los compuestos orgánicos son utilizados como materiales estructurales, suministrando energía para los procesos de oxidación y requeridos en concentraciones mayores que los otros elementos esenciales siendo utilizados por medio de la glucólisis y demás procesos metabólicos es por esto que la fructuosa y la glucosa se consideran las mejores fuentes para el óptimo crecimiento micelial.

Entre los monosacáridos, disacáridos y polisacáridos hay muy poca diferencia en cuanto a sus medias de crecimiento, siguen un patrón de crecimiento muy similar;

Monosacáridos \geq Disacáridos = Polisacáridos.

Mostrando una ligera inclinación hacia los monosacáridos esto por ser los glúcidos más sencillos y de esta manera pueden ser metabolizados de manera más rápida que los demás carbohidratos, seguida de los disacáridos y por último los polisacáridos.

En cuanto a la velocidad de crecimiento usando las fuentes de nitrógeno, los resultados corresponden a lo establecido por Moore (1996), que los aminoácidos, la urea y los nitratos son las mejores fuentes de nitrógeno para el crecimiento y la esporulación en hongos. Los hongos muestran especificidad por varias fuentes de nitrógeno o por alguna de ellas como ocurre con los aminoácidos siendo en este estudio la Alanina fuente orgánica la que mostró un crecimiento rápido y favorable en los cuatro valores de pH ensayados. Por el lado de las fuentes inorgánicas el Nitrato de sodio mostró mejor respuesta en los medios.

Alanina > Cisteína > Urea > Nitrato de sodio > Nitrito de sodio.

Orden de mejor desempeño en cuanto a la velocidad de crecimiento en fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico.

Fuentes de N orgánico > Fuentes de N inorgánico.

En estas fuentes se llevan a cabo porcentajes mayores de saturación esto al principio favorece al crecimiento del hongo pero al paso de las horas disminuye la colonización y sobrevivencia por la baja disponibilidad de oxígeno he aquí el comienzo de la conidiación, es favorecido por condiciones de pH ácido (Roncal *et al.*, 2002).

Los hongos difieren en su habilidad para usar diferentes fuentes de carbono para la reproducción. El crecimiento micelial es favorecido por monosacáridos (especialmente por glucosa o fructosa) al igual que la reproducción asexual (producción de conidias) la cual es favorecida por monosacáridos (Moore, 1996).

Los compuestos orgánicos son utilizados como materiales estructurales, suministrando energía para los procesos de oxidación y requeridos en concentraciones mayores que los otros elementos esenciales (Pérez y Ramírez, 2000).

La glucosa y la fructuosa son las fuentes de carbono más ampliamente utilizadas por los hongos. Soportan el crecimiento, siendo utilizadas por medio de la glucolisis

para la formación de ácido pirúvico; que mediante fermentación produce alcohol etílico, ácido acético y glicerol (Pérez y Ramírez, 2000). El sistema de transporte y la batería enzimática para el consumo de glucosa y fructuosa son constitutivos, así que no requieren un periodo de adaptación para la formación de enzimas en la fase logarítmica para que el crecimiento del hongo comience (Griffin, 1981).

En la mayoría de estas fuentes de carbono, las tasas de crecimiento no se correlacionan con conidiación; en algunos casos, permiten el crecimiento del micelio lento o muy pobre del hongo; por lo tanto, la conidiación podría ser una respuesta a la inanición. Sin embargo, hay otras fuentes de carbono en el que hay un crecimiento micelial rápido y la formación de conidias es clara; estos patrones de formación de conidias se sugieren que son debidos a diferentes potenciales redox sobre el catabolismo de las fuentes de carbono utilizadas (Friedl *et al.*, 2008).

Los nitratos, la urea y los aminoácidos son las mejores fuentes de nitrógeno para la esporulación. Los hongos muestran especificidad por varias fuentes de nitrógeno o por alguna de ellas como ocurre con los aminoácidos. La mezcla de aminoácidos es mejor que uno solo (Moore, 1996).

La formación de estructuras reproductivas también requiere determinadas concentraciones de minerales o vitaminas (Griffin, 1981).

El nitrógeno es requerido por los hongos para sintetizar aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos necesarios para la construcción del protoplasma. El porcentaje más alto de los compuestos de nitrógeno está en forma de proteína en la célula del hongo (Pérez y Ramírez, 2000).

Las fuentes primarias de nitrógeno promueven fuertemente la fotoconidiación en *Trichoderma* (Steyaert *et al.*, 2010c).

A porcentajes mayores de saturación se disminuye la colonización y sobrevivencia por la baja disponibilidad de oxígeno. Es favorecido por condiciones de pH ácido donde su población se incrementa por una mayor formación de conidioforos, por la germinación de conidias.

Es posible que algunos de los aminoácidos de dichas fuentes nutricionales introduzcan la expresión de los genes que controlan la esporulación ya que para que ocurra esta reproducción asexual se requiere la activación de muchos genes (Roncal *et al.*, 2002).

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

Una vez obtenidos los resultados que indicaban que se tiene una conidiación más rápida con fructosa y con alanina para la cepa de referencia, se procedió a realizar curvas de crecimiento usando ahora cuatro cepas silvestres, *H. lixii* / *T. harzianum*, *H. atroviridis* / *T. atroviride*, *H. rufa* / *T. viride* y *T. tomentosum*. Se sometieron a las mismas condiciones experimentales, incubación a 28°C, medición de crecimiento y tiempo de conidiación observándose resultados muy alentadores.

Tabla 14. CINETICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO MODIFICADO (FRUCTUOSA-ALANINA)		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (días ⁻¹)	TIEMPO DE CONIDIACION (h) a 28 °C
IMI	<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	0.01743512	48
CEPA 1	<i>Hypocrea lixii</i> / <i>Trichoderma harzianum</i>	0.01481676	42
CEPA 8	<i>Hypocrea atroviridis</i> / <i>Trichoderma atroviride</i>	0.01360859	60
CEPA 218	<i>Hypocrea rufa</i> / <i>Trichoderma viride</i>	0.01456188	42
CEPA 221	<i>Trichoderma tomentosum</i>	0.0159566	42

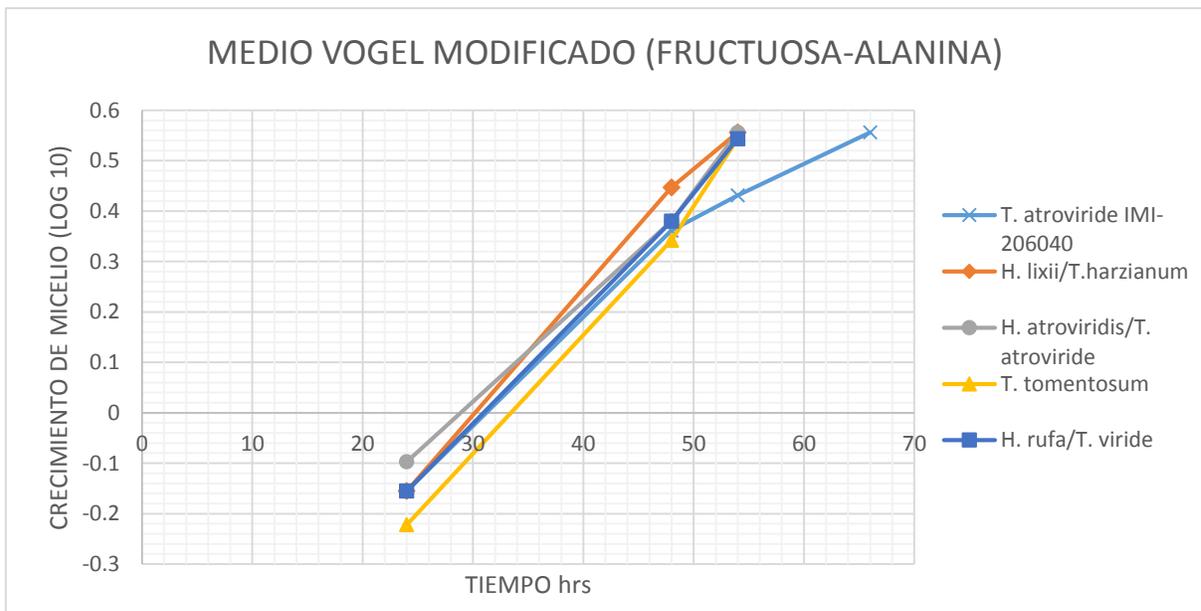


Fig 16. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel modificado en su fuente de Carbono y Nitrógeno con incubación a 28 °C.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

Al preparar un medio ideal combinando ambas fuentes (Fructosa-Alanina) disminuyo a la mitad el tiempo de crecimiento en la placa y por ende presento conidiación mucho más temprana. *Hypocrea lixii / Trichoderma harzianum*, *Hypocrea rufa /Trichoderma viride*, *Trichoderma tomentosum* las 3 anteriores con un tiempo de conidiación de 42 h presentando una conidiación muy difusa con tonalidad verde, seguido de *Trichoderma atroviride* IMI 206040 a las 48h conidio a manera de anillos concéntricos de tonalidad verde, verde-amarillento; finalmente, *Hypocrea atroviridis / Trichoderma atroviride* a las 60 h con una conidiación verde intenso difusa por el medio [Figura 16, Tabla 14].

Tabla 15. CINETICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO MINIMO VOGEL			
		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (días ⁻¹)	TIEMPO DE CONIDIACION (h) a 28 °C
IMI	<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	0.00501742	96
CEPA 1	<i>Hypocrea lixii / Trichoderma harzianum</i>	0.0051435	192
CEPA 8	<i>Hypocrea atroviridis / Trichoderma atroviride</i>	0.00497416	72
CEPA 218	<i>Hypocrea rufa /Trichoderma viride</i>	0.00261494	---
CEPA 221	<i>Trichoderma tomentosum</i>	0.00455031	120

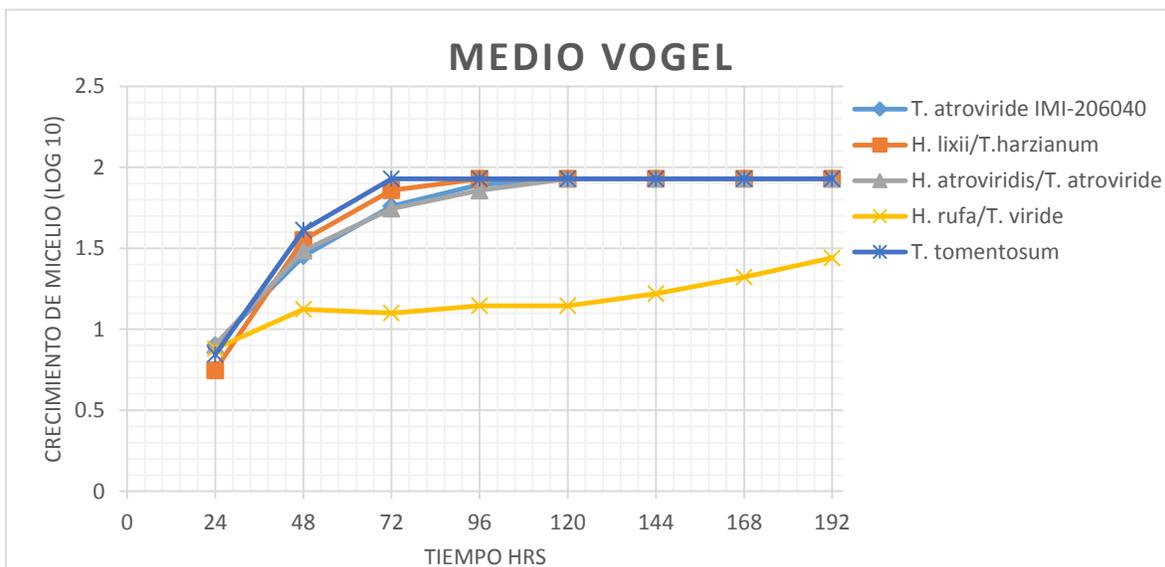


Fig 17. Cinética de crecimiento. Cultivos en agar Vogel a pH normal con incubación a 28 °C.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

Haciendo una comparación con trabajos anteriores (Ávila Quintero, 2013), donde realizó una cinética de crecimiento con estas mismas cepas silvestres pero cultivadas en medio mínimo Vogel incubadas a 28 °C sin ser sometidas a ningún tipo de estrés. Se compara al igual la velocidad de crecimiento, tiempo y forma de conidiación; en general presentaron un micelio algodonoso blanco, con conidiación color verde y verde amarillento, no hubo pigmento en el medio de cultivo. *T. atroviride* IMI-206040 presentó conidiación a las 72 h a manera de anillos concéntricos, los anillos centrales fueron de una tonalidad verde y los más externos coloración verde amarillento; *Hypocrea lixii*/ *T. harzianum* mostro a las 192 h conidiación difusa de tonalidad verde; *H. atroviridis*/*T. atroviride* presento una morfología macroscópica muy parecida a *T. atroviride* IMI-206040 con un tiempo de conidiación de 72 h; *H. rufa*/*T. viride* fue de lento crecimiento por lo que hubo necesidad de realizar daño mecánico, su conidiación fue verde solo en los lugares del daño; *T. tomentosum* presentó a las 120 h una conidiación muy difusa de tonalidad verde [Tabla 15, figura 17].

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para saber si hay diferencias significativas en el crecimiento de *Trichoderma atroviride* IMI 206040, como consecuencia de las diferentes condiciones ensayadas (pH del medio, fuentes de C y fuentes de N) se realizó un ANOVA, cuyos resultados se muestran a continuación:

H₀: El crecimiento es igual en todas las condiciones de crecimiento ensayadas.

H₁: El crecimiento depende de las condiciones de crecimiento ensayadas.

Tabla 16. ANOVA. COMPARACIÓN ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LOS DIFERENTES VALORES DE pH Y DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

ORIGEN DE LA VARIACION	F	VALOR CRÍTICO PARA F
Filas	4.246662728	2.661304523
Columnas	31.04079632	3.15990759

De acuerdo a la comparación realizada en la Tabla 16, el valor de "F" calculado es de 4.25 (fuentes de carbono) y es mayor que el valor crítico de la F (2.67), por lo que hay diferencias significativas entre las velocidades de crecimiento debido a la utilización de diferentes fuentes de carbono. El valor de la "F" para las columnas (valor de pH) es igual a 31. En otras palabras, existen diferencias significativas en las velocidades de crecimiento como consecuencia del pH del medio. Este resultado indica que existe una diferencia de crecimiento entre todas las fuentes de carbono

monosacáridos, disacáridos y polisacáridos con respecto a la variación en su pH. Por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 .

Tabla 17. PRUEBA t: DIFERENCIAS ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LOS DISTINTOS VALORES DE pH		
Muestra	Estadístico t	Valor crítico de t (dos colas)
Normal-pH5	-2.66154433	2.44691185
Normal-pH7	1.72076941	
Normal-pH8	8.50042902	
pH8-pH7	-10.04428991	

Como se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento como consecuencia del pH del medio, se decidió determinar cuáles valores de pH ocasionan una mayor velocidad (Tabla 17). En todos los casos se establecieron las siguientes hipótesis:

H_0 : Las velocidades de crecimiento entre los dos valores de pH probados son iguales.

H_1 : Las velocidades de crecimiento entre los dos valores de pH probados son diferentes.

Entonces se compararon los resultados de pH normal-pH5: Por tanto, dado que el valor estadístico t -2.66 es menor que el valor crítico (± 2.44), podemos decir que la diferencia entre las medias y por tanto, en las velocidades de crecimiento, siendo mayor a pH 5. Después se compararon los valores pH normal-pH7: muestra diferencia entre sus medias. pH normal-pH8: refleja una diferencia significativa entre el valor estadístico t y el valor crítico de un poco más del triple siendo a pH normal más rápido su crecimiento. pH8-pH7: diferencia significativa de casi 4 veces más entre su valor estadístico y los valores críticos mostrando mayor crecimiento a pH 7. Dado que en todas las comparaciones se encontraron diferencias significativas, se acepta H_1 .

Tabla 18. ANOVA. COMPARACIÓN ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LOS DIFERENTES TIPOS DE CARBOHIDRATOS Y LOS VALORES DE pH.		
GRUPOS	F	VALOR CRÍTICO PARA F
pH(5, sin modificar, 7, 8)	17.13384353	3.00878657
Monosacáridos (Fructuosa, Glucosa, Xilosa)	0.13558944	4.256494729
Disacáridos (Lactosa, Maltosa, Dextrosa)	1.589529644	
Monosacáridos-Polisacáridos (Fructuosa, Glucosa, Xilosa, Albumina)	0.092532796	3.490294819
Disacáridos-Polisacáridos (Lactosa, Maltosa, Dextrosa, Albumina)	1.028355704	
Disacáridos, Monosacáridos, Polisacáridos	1.056543579	2.772853153

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

Analizando las velocidades de crecimiento por grupos (Tabla 18) observamos estadísticamente que las diferentes variantes de pH muestra una F significativamente mayor que el valor crítico comprobando que hay diferencia entre sus medias y que en algunas en más rápido el desarrollo del hongo por lo que se establecieron las siguientes hipótesis:

H_0 : El crecimiento es igual en todas las condiciones de crecimiento ensayadas.

H_1 : El crecimiento depende de las condiciones de crecimiento ensayadas.

Entre los monosacáridos, disacáridos y polisacáridos la F calculada $< F$ crítica respectivas como lo indica la tabla 18, hay muy poca diferencia en cuanto a sus medias de crecimiento entre ellas, siguen un patrón de crecimiento muy similar. Por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 .

Tabla 19. ANOVA. COMPARACIÓN ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LAS DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO.

ORIGEN DE LA VARIACION	F	VALOR CRÍTICO PARA F
Filas	4.52038476	3.25916673
Columnas	12.8922526	3.49029482

En base a los resultados obtenidos en la Tabla 19 tomamos en cuenta lo siguiente:

H_0 : El crecimiento es igual en todas las condiciones de crecimiento ensayadas.

H_1 : El crecimiento depende de las condiciones de crecimiento ensayadas.

Se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento como consecuencia del pH del medio, optamos por determinar cuáles valores de pH ocasionan un mayor crecimiento. El valor de la "F" por filas (fuentes de nitrógeno) es 4,52 demostrando diferencia entre las velocidades de crecimiento ya que "F" crítico es 3.26. El valor de la "F" para las columnas (valor de pH) es igual a 12,9. Esto es también significativo, porque el valor de "F" crítico es solamente 3,5. En otras palabras, existe una diferencia significativa en las velocidades de crecimiento producidas por las diferentes fuentes de nitrógeno y los diferentes valores de pH. En vista que en todas las comparaciones se encontraron diferencias significativas, se acepta H_1 .

Tabla 20. PRUEBA t: DIFERENCIAS ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO PRODUCIDAS POR LOS DISTINTOS VALORES DE pH.

Muestra	Estadístico t	Valor crítico de t (dos colas)
Normal-pH5	-0.27813888	2.77644511
Normal-pH7	1.74394113	
Normal-pH8	5.22271741	
pH7-pH8	-3.59797408	

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

Observando las velocidades de crecimiento y sus diferencias respecto a las variantes en el pH (Tabla 20). Realizamos un estudio estadístico donde se observaron las siguientes hipótesis:

H₀: Las velocidades de crecimiento entre los dos valores de pH probados son iguales.

H₁: Las velocidades de crecimiento entre los dos valores de pH probados son diferentes.

Entonces comparamos qué: pHnormal-pH5: dado que el valor de t calculado t -0.28 es menor que el valor crítico ± 2.78 , podemos decir que no hay diferencia entre las medias, lo que implica que las velocidades de crecimiento en estos dos valores de pH pueden considerarse iguales. pHnormal-pH7: El valor de t calculado es menor que el valor crítico así que también puede considerarse que las velocidades de crecimiento son iguales. pHnormal-pH8: Dado que la t calculada es mayor que la t crítica, la velocidad de crecimiento es mayor a pH normal ya que a pH 8 tarda más en adaptarse al medio. pH8-pH7: La diferencia entre los valores de t calculada y la t crítica, indican que hay una diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento entre estos dos valores de pH, siendo mayor a pH 7. Puesto que en todas las comparaciones se encontraron diferencias significativas, se acepta H₁.

Tabla 21. ANOVA. COMPARACION ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO DEBIDAS A LOS DIFERENTES TIPOS DE FUENTES DE NITRÓGENO.

GRUPOS	F	Valor crítico para F
pH(5,sin modificar,7,8)	6.8572303	3.23887152
Fuentes de Nitrógeno Orgánicas (Alanina, Urea, Cisteína)	0.50893596	4.25649473
Fuentes de Nitrógeno Inorgánicas (Nitrito, Nitrato)	0.00010844	5.98737761
Orgánicos-Inorgánicos	1.33800532	3.05556828

Se analizaron las velocidades de crecimiento entre los diferentes valores de pH proponiendo las siguientes hipótesis:

H₀: El crecimiento es igual en todas las condiciones de crecimiento ensayadas.

H₁: El crecimiento depende de las condiciones de crecimiento ensayadas.

Comparando una *F* (6.86) calculada mayor que el valor crítico de *F* (3.34) comprobando que hay diferencia entre sus velocidades de crecimiento, se acepta la H₁. Entre las fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas presentan que la $F_{calculada} < F_{critica}$ respectivas como lo indica la Tabla 21, muestra que las velocidades de crecimiento pueden considerarse iguales y no hay influencia del tipo de fuente de nitrógeno. Por lo que se rechaza H₁ y se acepta H₀.

Tabla 22. PRUEBA t. COMPARACIÓN ENTRE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SILVESTRES EN EL MEDIO MÍNIMO VOGEL Y EL MEDIO VOGEL MODIFICADO.

Muestra	Estadístico t	Valor crítico de t (dos colas)
Medio Ideal(Fructuosa-Alanina)- Medio Mínimo Vogel	15.1021532	2.77644511

Se compararon las velocidades de crecimiento de las diferentes cepas silvestres en el medio mínimo Vogel normal y el modificado que se consideró como ideal (contiene Fructosa-Alanina) (Tabla 22). Se analizan en todos los casos estas hipótesis:

H₀: Las velocidades de crecimiento entre los dos valores de pH probados son iguales

H₁: Las velocidades de crecimiento entre los dos valores de pH probados son diferentes

Se encontró un valor de t calculad de 15.1 que es mayor que la t crítica (2.77) lo que indica que si hay diferencias significativas en las velocidades de crecimiento de las cepas silvestres en los dos medio de cultivo, siendo mayor la velocidad en el medio modificado. En base al análisis aceptamos H₁ y rechazamos H₀.

Para mayores detalles consultar anexo I.

En cuanto a la conidiación no hay cambios aparentes en la forma de las conidias vistas al microscopio de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (ver anexo IV) por lo que se procedió a corroborarlo por medio de la electroforesis capilar.

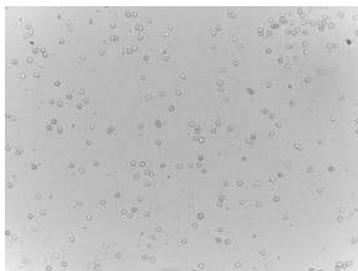


Fig 18. Conidias de *Trichoderma atroviride* IMI 206040 visto a 40 X.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS CONIDIAS OBTENIDAS EN EL MEDIO VOGEL MODIFICADO

Para realizar los análisis electroforéticos se seleccionaron los cultivos con mayor conidiación considerando el crecimiento en las diferentes fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno en el siguiente orden: monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, fuentes de nitrógeno orgánicas y fuentes de nitrógeno inorgánicas como se muestra ascendentemente en las figuras 19, 20, 21 y 22. Fructuosa como fuente de carbono y Alanina como fuente de nitrógeno se analizaron en las cuatro condiciones ya que son las que manifestaron mayor crecimiento y conidiación rápida de todas las fuentes probadas.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

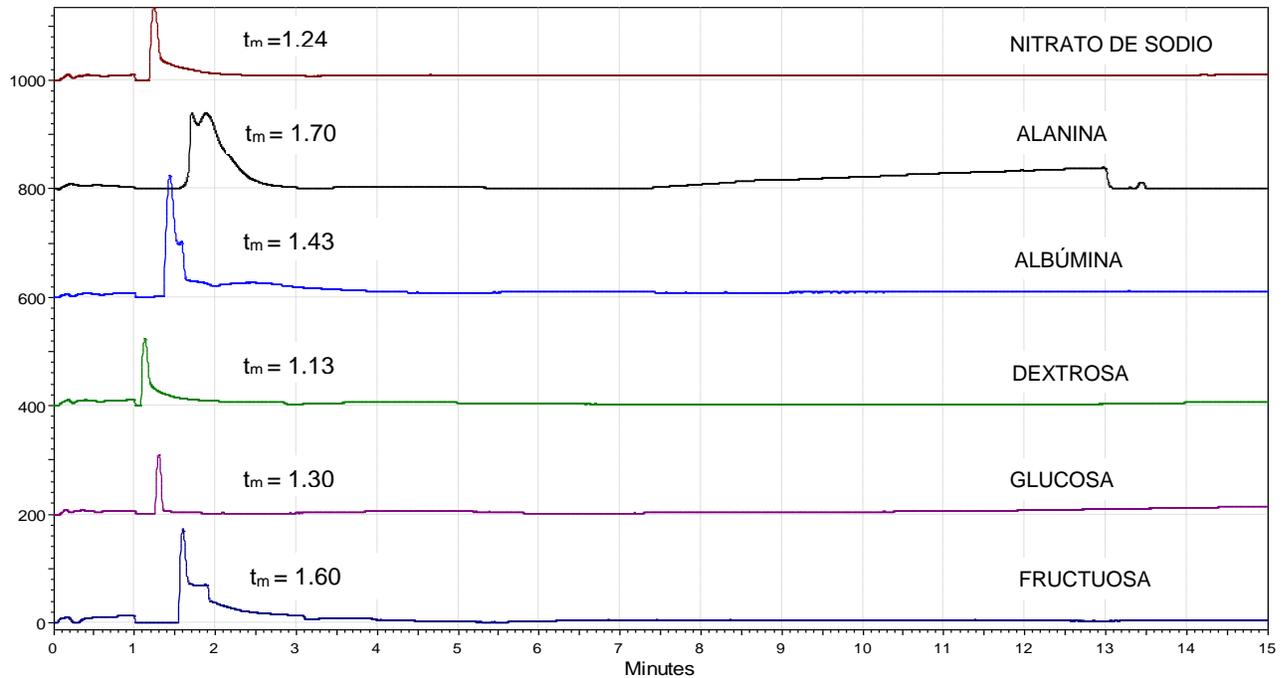


Figura 19. Electroferogramas de las conidias de *Trichoderma atroviride* IMI 206040 obtenidas con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno a pH 5 del medio. El buffer de corrimiento fue HEPES 10mM, pH 7 con CTAB 15 mM añadido a la muestra. Los análisis se realizaron a -17 KV. Demás condiciones se detallan en la parte experimental. t_m , corresponde al tiempo de migración.

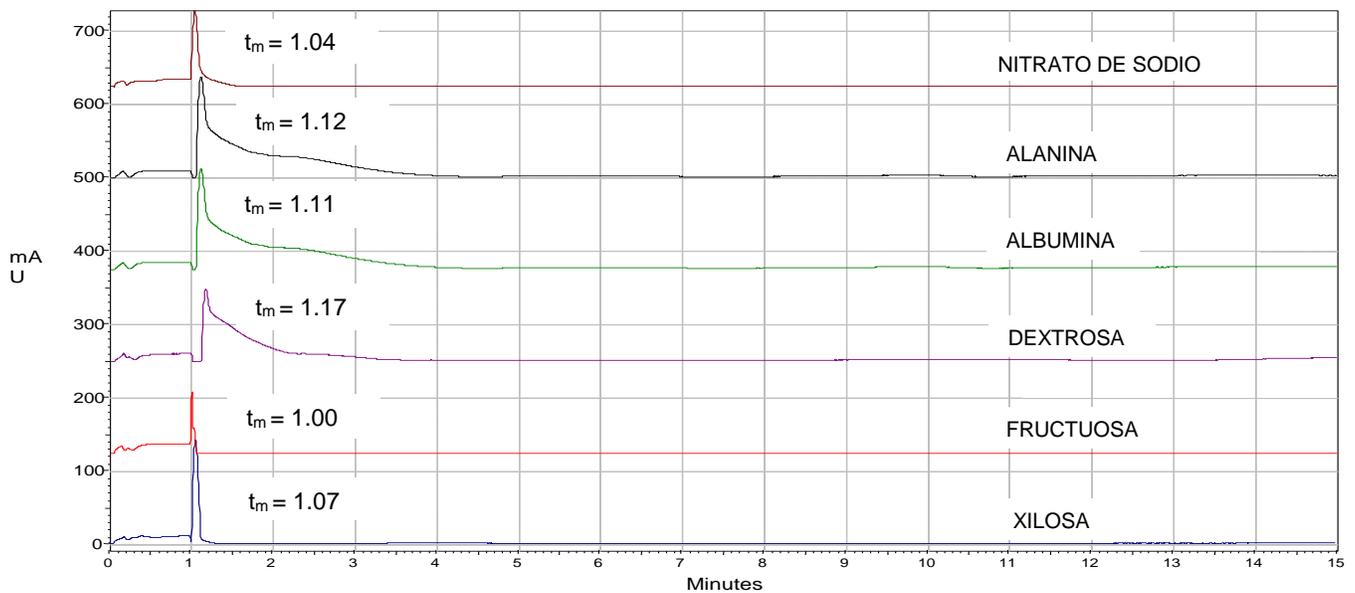


Figura 20. Electroferogramas de las conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 obtenidas con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno a pH normal (5.9) del medio. El buffer de corrimiento fue HEPES 10mM, pH 7 con CTAB 15 mM añadido a la muestra. Los análisis se realizaron a -17 KV. Demás condiciones se detallan en la parte experimental. t_m , corresponde al tiempo de migración.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

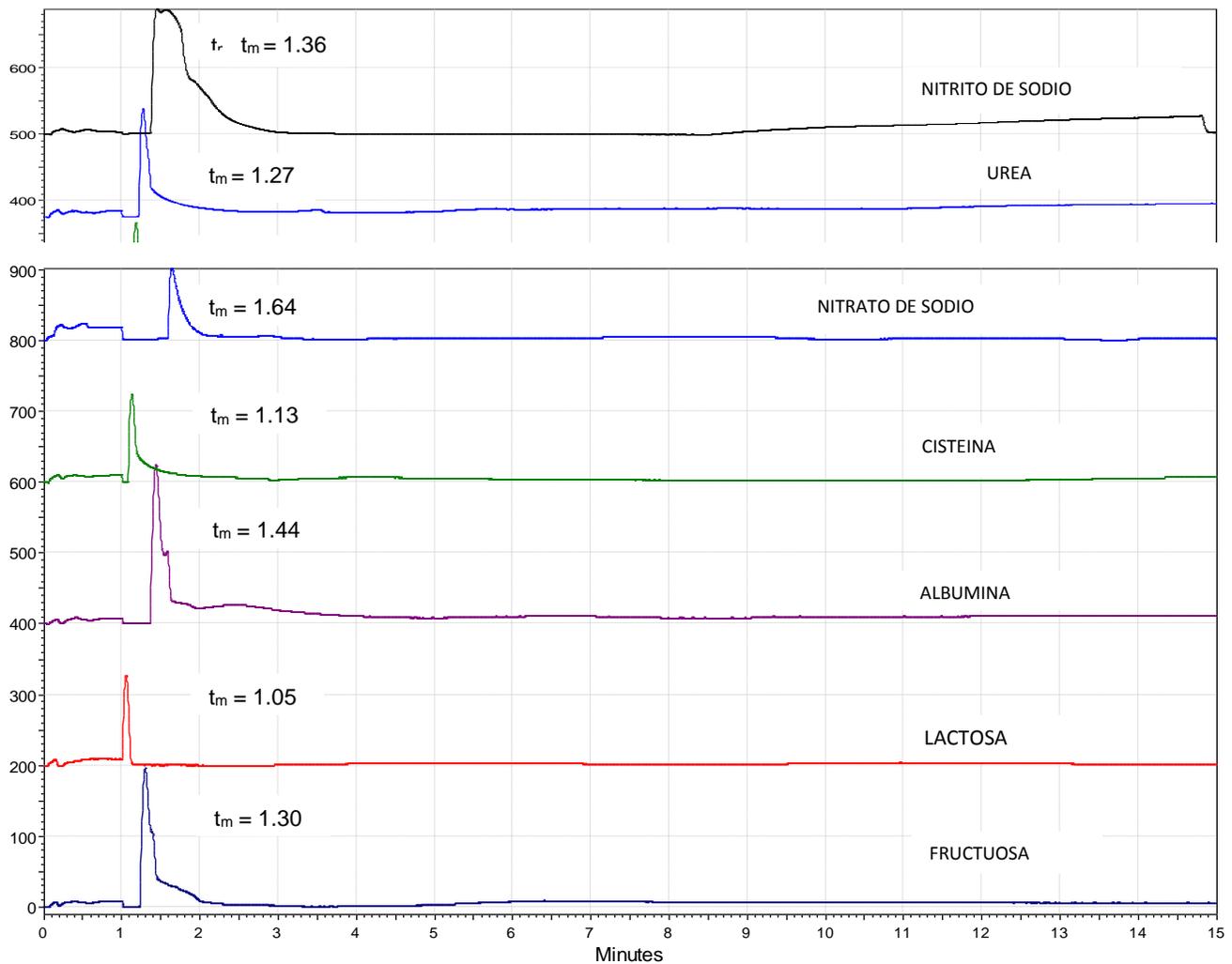


Figura 22. Electroferogramas de las conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 obtenidas con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno a pH 8 del medio. El buffer de corrimiento fue HEPES 10mM, pH 7 con CTAB 15 mM añadido a la muestra. Los análisis se realizaron a -17 KV. Demás condiciones se detallan en la parte experimental. t_m , corresponde al tiempo de migración.

Como se puede apreciar en las figuras 19, 20, 21 y 22 se logró agrupar las conidias en un solo pico electroforético agudo y definido por la interacción con el CTAB permitiendo una mayor compactación de las células en la banda electroforética durante la migración de éstas a través del capilar. La forma de los picos varía entre las diferentes fuentes en unos más definidos que en otras; esto puede indicar que hay ciertas diferencias tentativas en la superficie celular. A pesar de estas diferencias en las superficies celulares de las conidias, la mayoría muestra similitud en los tiempos de migración obtenidos. Estos tiempos son cortos y muestran ligeras diferencias entre ellos, por lo que se decidió aplicar una prueba de t para determinar

si, desde el punto de vista estadístico, se pueden considerar iguales o diferentes (Tabla 23).

Tabla 23. PRUEBA <i>t</i>. COMPARACIÓN ENTRE LOS VALORES DE TIEMPOS DE MIGRACIÓN OBTENIDOS PARA LAS CONIDIAS OBTENIDAS BAJO LAS DIFERENTES CONDICIONES DE pH.		
Muestra	Estadístico <i>t</i>	Valor crítico de <i>t</i> (dos colas)
pH5-pHNormal	0.983103739	2.570581836
pH7-pH8	-0.09144948	2.77644511

Ver anexo II.

En todos los casos se establecieron las siguientes hipótesis:

H₀: El tiempo de migración entre los dos valores de pH probados son iguales.

H₁: El tiempo de migración entre los dos valores de pH probados son diferentes.

De acuerdo a los resultados de la prueba de *t* en los tiempos de migración, se observa que no hay diferencias significativas dado que los valores de *t* calculados son menores que los valores de *t* críticos. Por tal motivo se rechaza H₁ y se acepta H₀.

Hay que considerar que los cambios en las condiciones del medio de cultivo al parecer no representaron un factor de estrés significativo en el crecimiento y conidiación del hongo. Es por eso que si llegó a haber cambios sutiles en su superficie no se alcanzaron a percibir en el corrimiento electroforético; sin embargo, si hay diferencias en las formas de los picos y habría que estudiar más detenidamente la razón.

VI. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontraron condiciones de rápido crecimiento y conidiación de una cepa de *Trichoderma atroviride* IMI 206040.

El pH que ocasionó un mayor crecimiento fue el pH 5; sin embargo, el pH normal del medio Vogel (5.9) propició una conidiación más rápida.

La fuente de carbono que ocasionó un mayor crecimiento y más pronta conidiación fue fructosa; mientras que la de N, fue alanina. La combinación de ambas fuentes en el medio de cultivo ocasionó un crecimiento aún mayor que los obtenidos de manera individual.

En este trabajo se buscaba era encontrar condiciones en las que se obtuvieran conidias más pronto. Entonces, usando las condiciones arriba mencionadas se logró disminuir el tiempo de conidiación de entre 4 y 5 días a dos, sin causar estrés a la cepa.

Las nuevas condiciones (medio Vogel pH 5.9, con fructosa y alanina) ocasionaron la conidiación en cuatro cepas silvestres en dos días a dos días y medio, sin necesidad de someter a estrés mecánico a la cepa.

Aparentemente no existen cambios en las superficies de las conidias obtenidas bajo las diferentes condiciones ensayadas, como se pudo apreciar por microscopia y los corrimientos electroforéticos. Estos últimos muestran diferencias sutiles que podrían abordarse en el futuro para establecer si hubo algún cambio en la estructura de la pared celular.

Si bien todos éstos factores ya han sido estudiados de manera independiente para diferentes microorganismos, la novedad de éste trabajo es que logra integrar, y utilizar, éstos parámetros, para describir la tasa específica de crecimiento y la forma y tiempo de conidiación de *Trichoderma atroviride* IMI-206040 superficialmente en una placa de agar, sujeto a diferentes modificaciones fuentes de carbono (glucosa, fructuosa, dextrosa, xilosa, maltosa, lactosa, albumina) y fuentes de nitrógeno (alanina, cisteína, urea, nitrato de sodio, nitrito de sodio).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150: 2029–2035.
- Agosin, E., Volpe, D., Muñoz, G., San Martín, y R., Crawford, A. 1997. Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13, 225-232.
- Alexopoulos, C.J., y Mims, C.W. 1979. *Introductory mycology* (3ª Ed.). New York: Willey.
- Alexopoulos CJ, Mims CW. 1985. *Introducción a la micología*. 3ª edición ed. Barcelona, España: Ediciones Omega;
- Armstrong DW, Schneiderheinze JM, Kullman JP and He L. 2001. Rapid CE microbial assays for consumer products that contain active bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 194: 33-37.
- Bahn, Y. S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J. & Cardenas, M. E. 2007. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* 5, 57–69.
- Boa, E. 2004. Los hongos silvestres comestibles. *Perspectiva global de su uso e importancia para la población*, No. 17. FAO, Roma. 161 p.
- Carlile M. J., Watkinson S. C., and Gooday G. W. 2000. *The Fungi*, 2nd ed. Academic Press, London, p. 53.
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P. & Herrera Estrella, A. (2004). BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150, 3561–3569.
- Castagnino JM. Electroforesis Capilar. 1999 *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 33 (3): 297 – 329.
- Castagnino JM. Electroforesis capilar. 2000. *Bioquímica*. 25 (1): 13-32
- Castillo Rodríguez MA, Revilla Vázquez AL, López Arellano R, Rivera García P. 2005. *Fundamentos de electroforesis capilar*. 1a ed. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 180 p.
- Cázares García SV. 2009. Movilidad electroforética de células fúngicas. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich.
- Cázares-García SV. 2007. Estudio de la Factibilidad del Análisis de Células Fúngicas por Electroforesis Capilar. Tesis de Licenciatura. Escuela de Químico Farmacobiología. Morelia, Michoacán. México.
- Chen FA, Lui C, Hsieh Y, Sternberg JC. 1991. Capillary electrophoresis- a new clinical tool. *Clinical Chemistry*. 37 (1): 14-19

- Desai MJ and Armstrong DW. 2003. Separation, Identification and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(1): 38-51.
- D.N. Heiger, A.S. Cohen, B.L. Karger, 2000. Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields. *J. Chromatogr.*, 516, 33–48
- Dr. Guillermo Aguilar Osorio. 2012. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Socio Fundador y ex-tesorero de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. *BioTecnología*, Vol. 16 No. 4
- Druzhinina, I. & Kubicek, C. P. 2005. Species concept and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J Zhejiang Univ Sci B* 6, 100–112.
- Fischer R, Kües U. 2006. Asexual Sporulation in Mycelial Fungi. In: Esser K, editor. *The Mycota*. 2da ed. New York, EUA: Springer; p. 263-92.
- Friedl, M. A., Kubicek, C. P. & Druzhinina, I. S. 2008. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. *Appl Environ Microbiol* 74, 245–250.
- Gams W, Bissett J. 2002. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocadium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Pennsylvania, EUA: Taylor and Francis; pp. 3-34.
- García CV and Cifuentes A. 2007. Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques. *Electrophoresis*. 28: 4013-4030.
- Girod M, Armstrong DW. 2002. Monitoring the migration behaviour of living microorganism in capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection with a chargecoupled device imaging system. *Electrophoresis* 23:2048-2056.
- Gresík, M., Kolarova, N. & Farkas, V. 1991. Hyperpolarization and intracellular acidification in *Trichoderma viride* as a response to illumination. *J Gen Microbiol* 137, 2605–2609.
- Griffin, D. 1981. *Fungal physiology*. A Wiley-Interscience publication, USA. New York. Pp. 102-127 260-279.
- Guzmán, G. 2008a. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International J. Medicinal Mushrooms* 10:209-217.
- Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M. 2012. Special issue: *Trichoderma* from basic Biology to Biotechnology. *Microbiology*. 158(Pt 1):1-2. Epub 2012/01/03.

- Harris CD. 2001. Métodos cromatográficos y Electroforesis Capilar. En: Análisis Químico Cuantitativo. 5ª Edición, correspondiente a la 5ª Edición original norteamericana. Editorial Reverté S.A. México. p. 733-761.
- Herrera T y Ulloa M. 1998. Hongos de Importancia etnológica e industrial. Obtención de alimentos y bebidas fermentadas, fármacos y otros productos de importancia industrial. En El reino de los hongos: micología básica y aplicada. 2ª Edición. Editorial UNAM, IB y FCE. pp. 461-481.
- Horwitz, B. A., Gressel, J. & Malkin, S. 1985. Photoperception mutants in *Trichoderma*: mutants that sporulate in response to stress but not light. *Curr Genet* 9, 605–613.
- Jackowski M, Szeliga J, Klodzinska E and Buszewski B. 2008. Application of capillary zone electrophoresis (CZE) to the determination of pathogenic bacteria for medical diagnosis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391: 2153-2160.
- Jaklitsch WM. 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in mycology*.;63:1-91. Epub 2009/10/15.
- James TY and co-workers. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443: 818-822.
- Klein D, Eveleigh DE. 2002. Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Pennsylvania, EUA: Taylor and Francis; p. 57-74.
- Klein, D. & Eveleigh, D. E. 1998. Basic biology, taxonomy and genetics 1. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 57–73. Edited by C. P. Kubicek & G. E. Harman. London: Taylor & Francis.
- Klodzinska E, Buszewski B. 2009. Electrokinetic detection and characterization of intact microorganisms. *Analytical chemistry*; 81(1):8-15. Epub 2009/01/07.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC y Winn WC. 1999. Micología. En: Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a Color. 5ª Edición. Ed. Médica Panamericana. pp: 955-1037.
- Kubicek Pranz EM. 2002. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Pennsylvania, EUA: Taylor and Francis; p. 95-119.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Sammuels, G.J. Meyer, W, Kubicek, C.P., y Börner, T. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 89, 442-460.
- Lantz AW, Bao Y and Armstrong DW. 2007. Single – Cell Detection: Test of Microbial Contamination Using Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 79: 1720-1724.

- Lieckfeldt, E., Kuhls, K., y Muthumeenakshi, S. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: C.P. Kubicek y Harman, G.E. (Eds.) *Molecular taxonomy of Trichoderma and Gliocladium and their teleomorphs* (pp. 35-56). London: Taylor & Francis Ltd.
- López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F, Castañón Olivares R. 2006. *Micología médica: procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 2ª edición ed. México, D.F.: Editorial Trillas; 192 p.
- Mayayo AE. 2004. Diagnóstico histopatológico de las micosis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17:S23-S28.
- Moore, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. Cuarta Edición. Prentice Hall. New Jersey. 574 p.
- Moreno-Mateos, M. A., Delgado-Jarana, J., Codoñer, A. C. & Benítez, T. 2000. pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genet Biol* 44, 1355–1367.
- Nemcovic, M., Jakubičková, L., Viđen, I. & Farkas, V. 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiol Lett* 284, 231–236.
- Oda RP and Landers JP. 1997. Introduction to capillary electrophoresis. *Handbook of Capillary Electrophoresis*. Second Edition.
- Palenzuela B, Simonet BM, García RM, Rios A and Varcárcel M. 2004. Monitoring of Bacterial Contamination in Food Samples Using Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 76: 3012-3017.
- Pérez, L.; Ramírez. C. 2000. Efecto de variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*. Bogotá. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. 153p.
- Pontón J. 2002. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19: 25-29.
- Pontón J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25: 78-82.
- Quindós G. 2002. Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19: 1-4.
- R. Ertola, O. Yantorno, C. Mignone. 2003. *Microbiología industrial*, editorial McGraw-Hill, Madrid. Pág. 43-53.
- Roncal, T.; Cordobe, S.; Sterner, O.; Ugalde, U. 2002 Conidiation in *Penicillium cycloim* in induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. *Eukaryotic cell*. 1: 823-829.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

- Rossmann, A.Y., Samuels, G.J., Rogerson, C.T., y Lowen, R. 1999. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). *Stud. Mycol.*, 42, 1-248.
- Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* 100, 923–935.
- Shaw BD, Hoch HC. 2007. Ions Regulate Spore Attachment, Germination, and Fungal Growth. In: Esser K, editor. *The Mycota*. 2da ed. New York, EUA: Springer; p. 219-36.
- Šimkovič, M., Ditte, P., Kurucová, A., Lakatos, B. & Varecka, L. 2008. Ca²⁺ dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. *Can J Microbiol* 54, 291–298.
- Simonet BM, Ríos A and Valcárcel M. 2008. Capillary Electrophoresis Separation of Microorganisms. From: *Methods in Molecular Biology*. Capillary Electrophoresis. Edited by: P. Schmitt-Kopplin Humana Press Inc. Totowa, NJ. 384: 569-590.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 2001. *Principios de análisis instrumental*. 5ta ed. Madrid, España: McGraw-Hill;
- Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A. & Stewart, A. 2010a. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology* 156, 2887–2900.
- Steyaert, J. M., Weld, R. J. & Stewart, A. 2010b. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biol* 114, 198–208.
- Steyaert, J. M., Weld, R. J. & Stewart, A. 2010c. Isolate-specific conidiation in *Trichoderma* in response to different nitrogen sources. *Fungal Biol* 114, 179–188.
- Tronsmo, A., y Harman, G.E. 1992. Coproduction of chitinolytic enzymes and biomass for biological control by *Trichoderma harzianum* on media containing chitin. *Biological Control*, 2, 272-277.
- Valverde MI. 2002. Desarrollo de nuevas metodologías analíticas mediante Electroforesis Capilar. De <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0406163-215825/>
- Van der Mei HC and Busscher HJ. 2001. Electrophoretic Mobility Distributions of Single-Strain Microbial Populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (2): 491 – 494.
- Widden, P., y Abitbol, J.J. 1980. Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce forest soil. *Mycologia*, 72, 775-784.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE VELOCIDADES DE CRECIMIENTO EN FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO Y SUS VARIANTES EN EL pH.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO FUENTES DE CARBONO

	pH 8	pH 7	pH 5	Normal
FRUCTUOSA	0.00849943	0.01556	0.01709004	0.01663481
LACTOSA	0.00454298	0.00979895	0.01068601	0.01272024
XILOSA	0.01045865	0.01527091	0.01716223	0.01292292
GLUCOSA	0.00885166	0.01531837	0.02088054	0.01663481
DEXTROSA	0.0099408	0.01577961	0.0209394	0.01702564
MALTOSA	0.00424632	0.01148223	0.02092511	0.01282671
ALBUMINA	0.00745902	0.01041183	0.02070807	0.01701907

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
pH 8	7	0.053998866	0.007714124	6.09135E-06
pH 7	7	0.093621891	0.013374556	7.17976E-06
pH 5	7	0.128391397	0.018341628	1.45058E-05
Normal	7	0.105784204	0.015112029	4.612E-06

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00041621	3	0.000138737	17.13384353	3.66126E-06	3.00878657
Dentro de los grupos	0.000194334	24	8.09723E-06			
Total	0.000610544	27				

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
FRUCTUOSA	4	0.057784282	0.014446071	1.61282E-05
LACTOSA	4	0.037748176	0.009437044	1.21407E-05
XILOSA	4	0.055814701	0.013953675	8.43588E-06
GLUCOSA	4	0.061685388	0.015421347	2.48155E-05
DEXTROSA	4	0.063685445	0.015921361	2.07291E-05
MALTOSA	4	0.049480373	0.012370093	4.67269E-05
ALBUMINA	4	0.055597993	0.013899498	3.65773E-05
pH 8	7	0.053998866	0.007714124	6.09135E-06
pH 7	7	0.093621891	0.013374556	7.17976E-06
pH 5	7	0.128391397	0.018341628	1.45058E-05
Normal	7	0.105784204	0.015112029	4.612E-06

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0.000113883	6	1.89804E-05	4.246662728	0.007760062	2.661304523
Columnas	0.00041621	3	0.000138737	31.04079632	2.50055E-07	3.15990759
Error	8.04509E-05	18	4.46949E-06			
Total	0.000610544	27				

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Normal</i>	<i>pH 5</i>
Media	0.01511203	0.01834163
Varianza	4.612E-06	1.4506E-05
Observaciones	7	7
Coefficiente de correlación de Pearson	0.53861119	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	-2.66154433	
P(T<=t) una cola	0.01872337	
Valor crítico de t (una cola)	1.94318028	
P(T<=t) dos colas	0.03744674	
Valor crítico de t (dos colas)	2.44691185	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Normal</i>	<i>pH 7</i>
Media	0.01511203	0.01337456
Varianza	4.612E-06	7.1798E-06
Observaciones	7	7
Coefficiente de correlación de Pearson	0.40449091	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	1.72076941	
P(T<=t) una cola	0.06803984	
Valor crítico de t (una cola)	1.94318028	
P(T<=t) dos colas	0.13607969	
Valor crítico de t (dos colas)	2.44691185	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Normal</i>	<i>pH 8</i>
Media	0.01511203	0.00771412
Varianza	4.612E-06	6.0913E-06
Observaciones	7	7
Coefficiente de correlación de Pearson	0.50953777	

EFEECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

Diferencia hipotética de las medias	0
Grados de libertad	6
Estadístico t	8.50042902
P(T<=t) una cola	7.2544E-05
Valor crítico de t (una cola)	1.94318028
P(T<=t) dos colas	0.00014509
Valor crítico de t (dos colas)	2.44691185

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>pH 8</i>	<i>pH 7</i>
Media	0.007714124	0.013374556
Varianza	6.09135E-06	7.17976E-06
Observaciones	7	7
Coefficiente de correlación de Pearson	0.835299857	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	-10.04428991	
P(T<=t) una cola	2.82391E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1.943180281	
P(T<=t) dos colas	5.64782E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.446911851	

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
FRUCTUOSA	4	0.057784282	0.014446071	1.61282E-05
XILOSA	4	0.055814701	0.013953675	8.43588E-06
GLUCOSA	4	0.061685388	0.015421347	2.48155E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4.46357E-06	2	2.23178E-06	0.13558944	0.87495148	4.256494729
Dentro de los grupos	0.000148139	9	1.64599E-05			
Total	0.000152602	11				

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
LACTOSA	4	0.037748176	0.009437044	1.21407E-05
DEXTROSA	4	0.063685445	0.015921361	2.07291E-05
MALTOSA	4	0.049480373	0.012370093	4.67269E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

Entre grupos	8.43475E-05	2	4.21738E-05	1.589529644	0.25634771	4.256494729
Dentro de los grupos	0.00023879	9	2.65322E-05			
Total	0.000323138	11				

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
LACTOSA	4	0.037748176	0.009437044	1.21407E-05
DEXTROSA	4	0.063685445	0.015921361	2.07291E-05
MALTOSA	4	0.049480373	0.012370093	4.67269E-05
ALBUMINA	4	0.055597993	0.013899498	3.65773E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8.96012E-05	3	2.98671E-05	1.028355704	0.414687432	3.490294819
Dentro de los grupos	0.000348522	12	2.90435E-05			
Total	0.000438123	15				

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
FRUCTUOSA	4	0.057784282	0.014446071	1.61282E-05
XILOSA	4	0.055814701	0.013953675	8.43588E-06
GLUCOSA	4	0.061685388	0.015421347	2.48155E-05
ALBUMINA	4	0.055597993	0.013899498	3.65773E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5.96538E-06	3	1.98846E-06	0.092532796	0.962737897	3.490294819
Dentro de los grupos	0.000257871	12	2.14892E-05			
Total	0.000263836	15				

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
FRUCTUOSA	4	0.057784282	0.014446071	1.61282E-05
LACTOSA	4	0.037748176	0.009437044	1.21407E-05
XILOSA	4	0.055814701	0.013953675	8.43588E-06
GLUCOSA	4	0.061685388	0.015421347	2.48155E-05
DEXTROSA	4	0.063685445	0.015921361	2.07291E-05
MALTOSA	4	0.049480373	0.012370093	4.67269E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.000113558	5	2.27115E-05	1.056543579	0.416088644	2.772853153
Dentro de los grupos	0.000386929	18	2.14961E-05			
Total	0.000500486	23				

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

ANÁLISIS ESTADÍSTICO FUENTES DE NITRÓGENO

	pH 8	pH 7	pH 5	Normal
ALANINA	0.01201214	0.01275605	0.01697715	0.01476795
UREA	0.00777185	0.01537582	0.01254777	0.01325619
CISTEINA	0.00988783	0.01286723	0.01599835	0.01711767
NITRITO	0.00527618	0.01032061	0.01108235	0.01254978
NITRATO	0.00210566	0.00969943	0.0148928	0.01266456

Análisis de varianza de un factor

<i>RESUMEN</i>					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
pH 8	5	0.03805319	0.00761064	1.2106E-05	
pH 7	5	0.06337428	0.01267486	3.4969E-06	
pH 5	5	0.08258254	0.01651651	9.8309E-06	
Normal	5	0.08144871	0.01628974	2.7877E-06	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico F
Entre grupos	0.00026021	3	8.6735E-05	12.293385	0.00020047	3.23887152
Dentro de los grupos	0.00011289	16	7.0554E-06			
Total	0.00037309	19				

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ALANINA	4	0.0565133	0.01412832	4.9621E-06
UREA	4	0.04895163	0.01223791	1.0308E-05
CISTEINA	4	0.05587108	0.01396777	1.0634E-05
NITRITO	4	0.03922893	0.00980723	9.9805E-06
NITRATO	4	0.03936245	0.00984061	3.1116E-05
pH 8	5	0.03705367	0.00741073	1.5035E-05
pH 7	5	0.06101915	0.01220383	5.1563E-06
pH 5	5	0.07149842	0.01429968	5.9566E-06
Normal	5	0.07035615	0.01407123	3.681E-06

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	7.1718E-05	4	1.793E-05	4.52038476	0.01856345	3.25916673

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

Columnas	0.00015341	3	5.1136E-05	12.8922526	0.00046148	3.49029482
Error	4.7597E-05	12	3.9664E-06			
Total	0.00027272	19				

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Normal</i>	<i>pH 5</i>
Media	0.01407123	0.01429968
Varianza	3.681E-06	5.9566E-06
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0.66891174	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0.27813888	
P(T<=t) una cola	0.39734551	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.79469101	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Normal</i>	<i>pH 7</i>
Media	0.01407123	0.01220383
Varianza	3.681E-06	5.1563E-06
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0.35627056	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1.74394113	
P(T<=t) una cola	0.07805867	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.15611734	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Normal</i>	<i>pH 8</i>
Media	0.01407123	0.00741073
Varianza	3.681E-06	1.5035E-05
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0.71135566	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	5.22271741	
P(T<=t) una cola	0.00320777	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.00641554	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
ALANINA	4	0.0565133	0.01412832	4.9621E-06
UREA	4	0.04895163	0.01223791	1.0308E-05
CISTEINA	4	0.05587108	0.01396777	1.0634E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8.7892E-06	2	4.3946E-06	0.50893596	0.6174498	4.25649473
Dentro de los grupos	7.7714E-05	9	8.6348E-06			
Total	8.6503E-05	11				

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
NITRITO	4	0.03922893	0.00980723	9.9805E-06
NITRATO	4	0.03936245	0.00984061	3.1116E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.2283E-09	1	2.2283E-09	0.00010844	0.99202895	5.98737761
Dentro de los grupos	0.00012329	6	2.0548E-05			
Total	0.00012329	7				

ANÁLISIS ESTADÍSTICO CEPAS SILVESTRES

CEPA	LOG 10 MEDIO IDEAL	LOG 10 VOGEL
<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	0.01743512	0.00501742
<i>H. lixii/T.harzianum</i>	0.01481676	0.0051435
<i>H. atroviridis/T. atroviride</i>	0.01360859	0.00497416
<i>H. rufa/T. viride</i>	0.01456188	0.00261494
<i>T. tomentosum</i>	0.0159566	0.00455031

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
LOG 10 MEDIO IDEAL	5	0.07637895	0.01527579	2.1565E-06
LOG 10 VOGEL	5	0.02230033	0.00446007	1.1137E-06

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00029245	1	0.00029245	178.85743	9.3487E-07	5.31765507
Dentro de los grupos	1.3081E-05	8	1.6351E-06			
Total	0.00030553	9				

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
IMI	2	0.02245254	0.01122627	7.71E-05
H. lixii/T.harzianum	2	0.01996026	0.00998013	4.6786E-05
H. atroviridis/T. atroviride	2	0.01858276	0.00929138	3.7277E-05
H. rufa/T. viride	2	0.01717682	0.00858841	7.1365E-05
T. tomentosum	2	0.02050691	0.01025345	6.5052E-05
LOG 10 MEDIO IDEAL	5	0.07637895	0.01527579	2.1565E-06
LOG 10 VOGEL	5	0.02230033	0.00446007	1.1137E-06

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	7.9518E-06	4	1.9879E-06	1.55035568	0.34066554	6.38823291
Columnas	0.00029245	1	0.00029245	228.075031	0.00011205	7.70864742
Error	5.129E-06	4	1.2823E-06			
Total	0.00030553	9				

Prueba t para medias de dos muestras

	<i>LOG 10 MEDIO IDEAL</i>	<i>LOG 10 VOGEL</i>
Media	0.01527579	0.00446007
Varianza	2.1565E-06	1.1137E-06
Observaciones	5	5
Coeficiente de correlación de Pearson	0.22768353	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	15.1021532	
P(T<=t) una cola	5.6024E-05	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.00011205	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

ANEXO II

TIEMPOS DE MIGRACIÓN

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>pH 5</i>	<i>pH Normal</i>
Media	1.4	1.085
Varianza	0.04788	0.00371
Observaciones	6	6
Coeficiente de correlación de Pearson	-0.338121796	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	0.983103739	

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Thichoderma spp.*

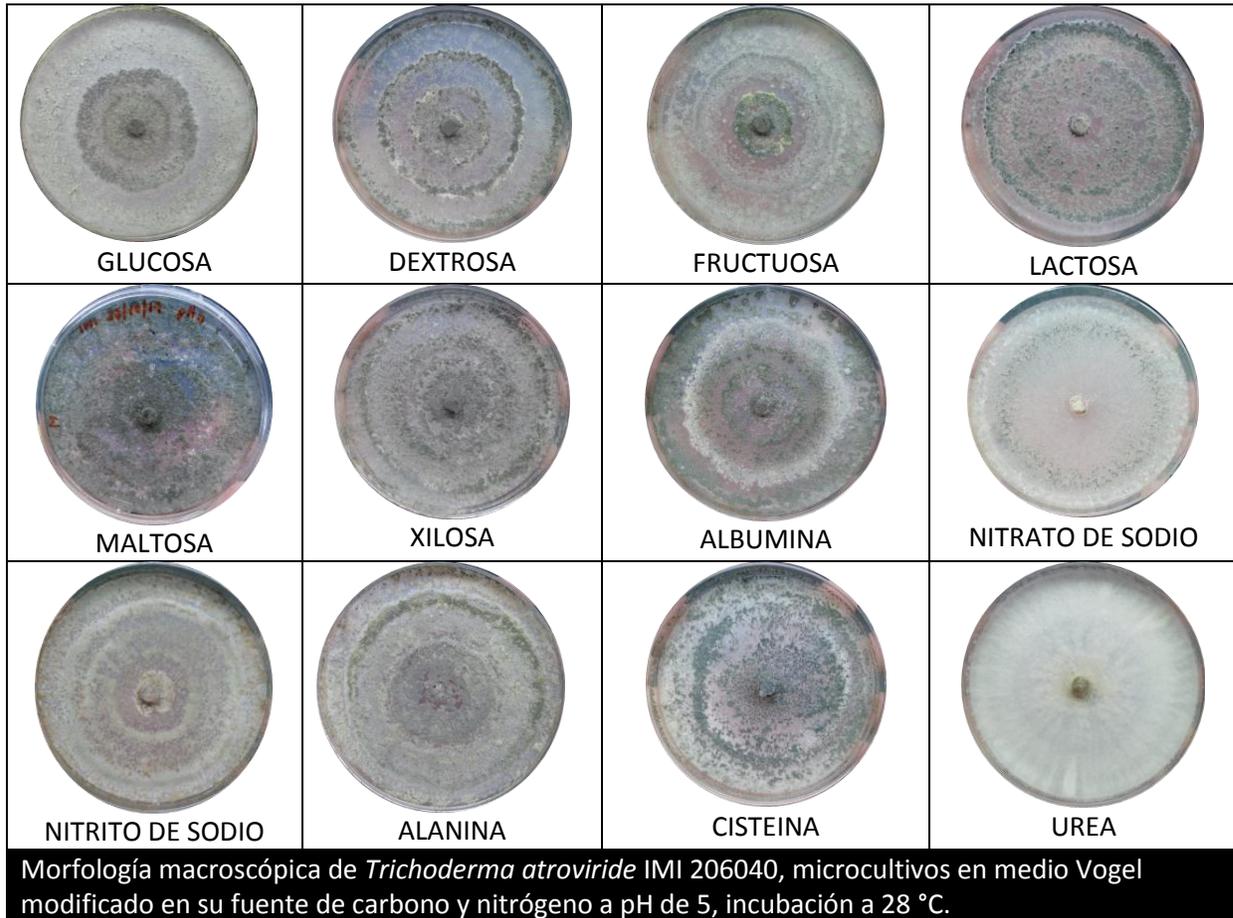
P(T<=t) una cola	0.185351916
Valor crítico de t (una cola)	2.015048373
P(T<=t) dos colas	0.370703832
Valor crítico de t (dos colas)	2.570581836

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

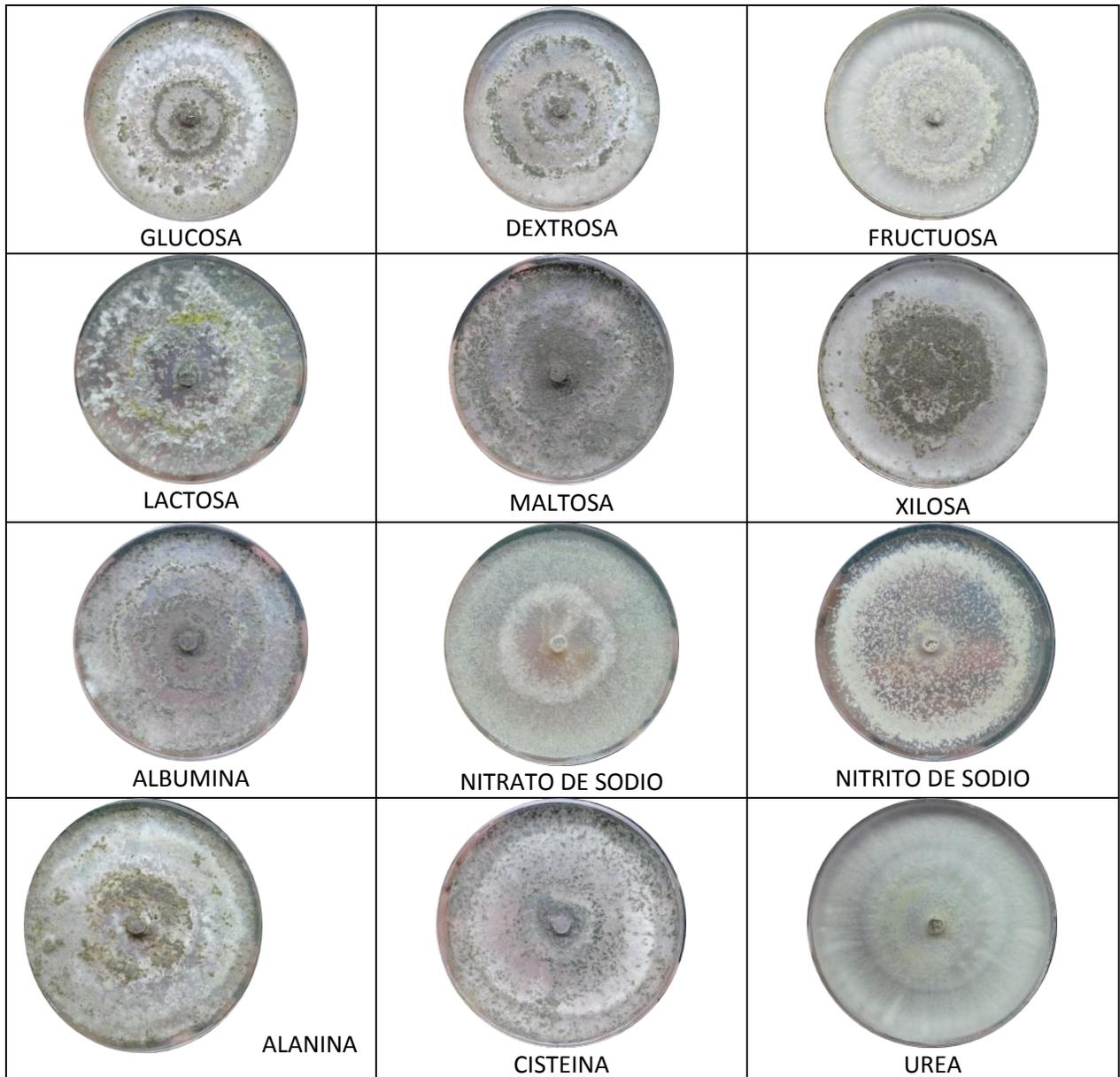
	pH 7	pH 8
Media	1.248	1.312
Varianza	0.03257	0.05647
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0.09144948	
P(T<=t) una cola	0.46576606	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.93153213	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

ANEXO III

Morfología macroscópica de *Trichoderma atroviride* IMI 206040, microcultivos en medio Vogel modificado en su fuente de carbono y nitrógeno a pH de 5, pH normal (5.90), pH 7 y pH 8, incubación a 28 °C.

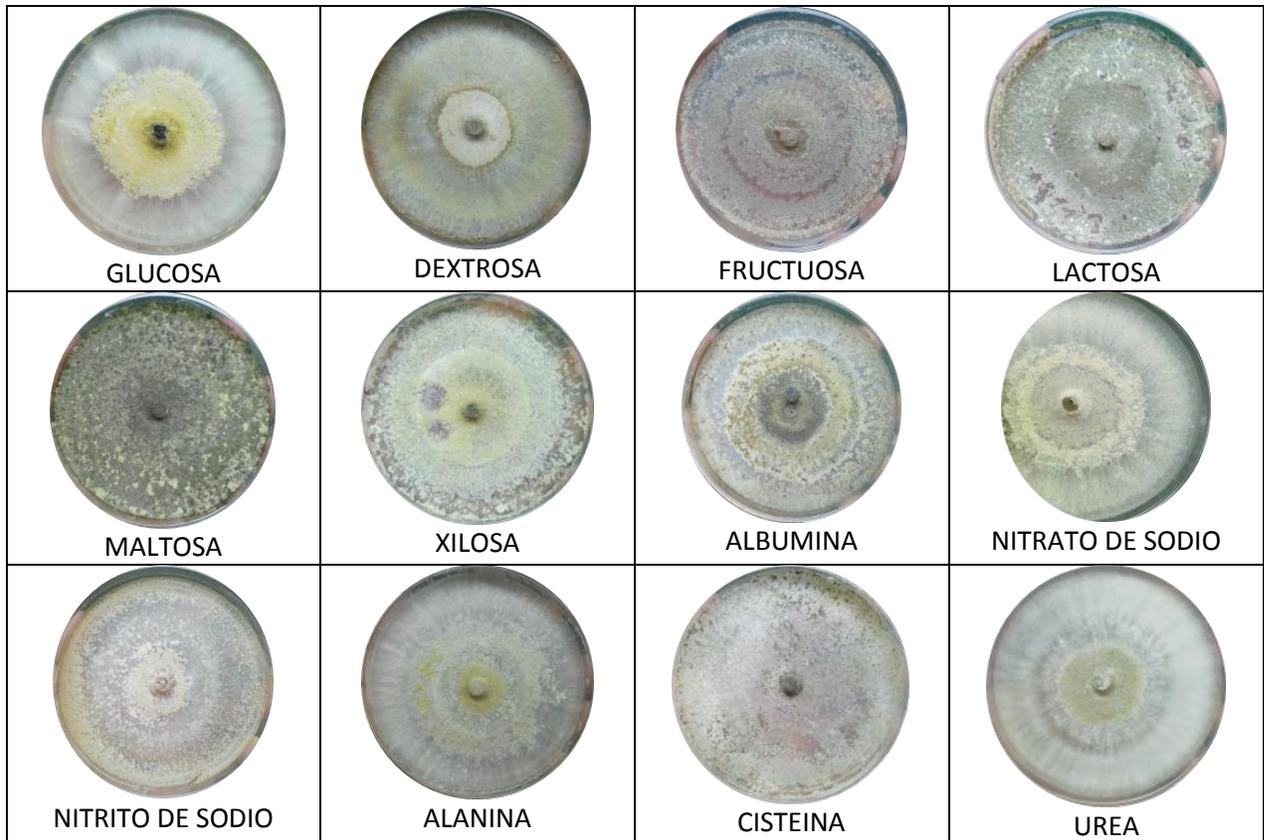


EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*



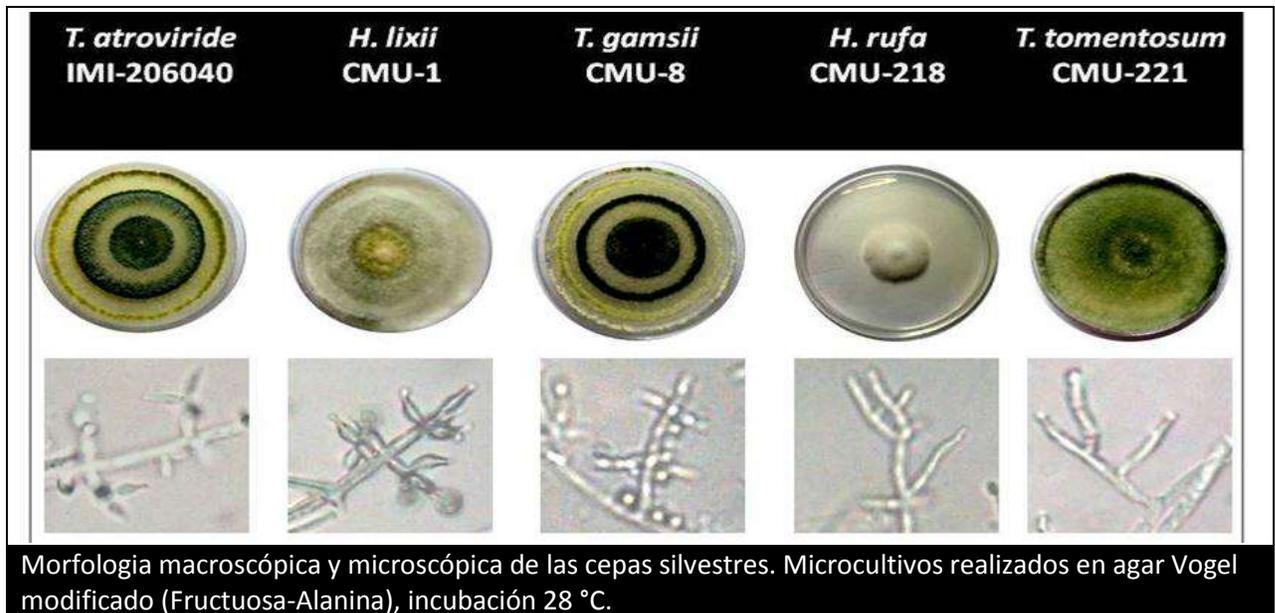
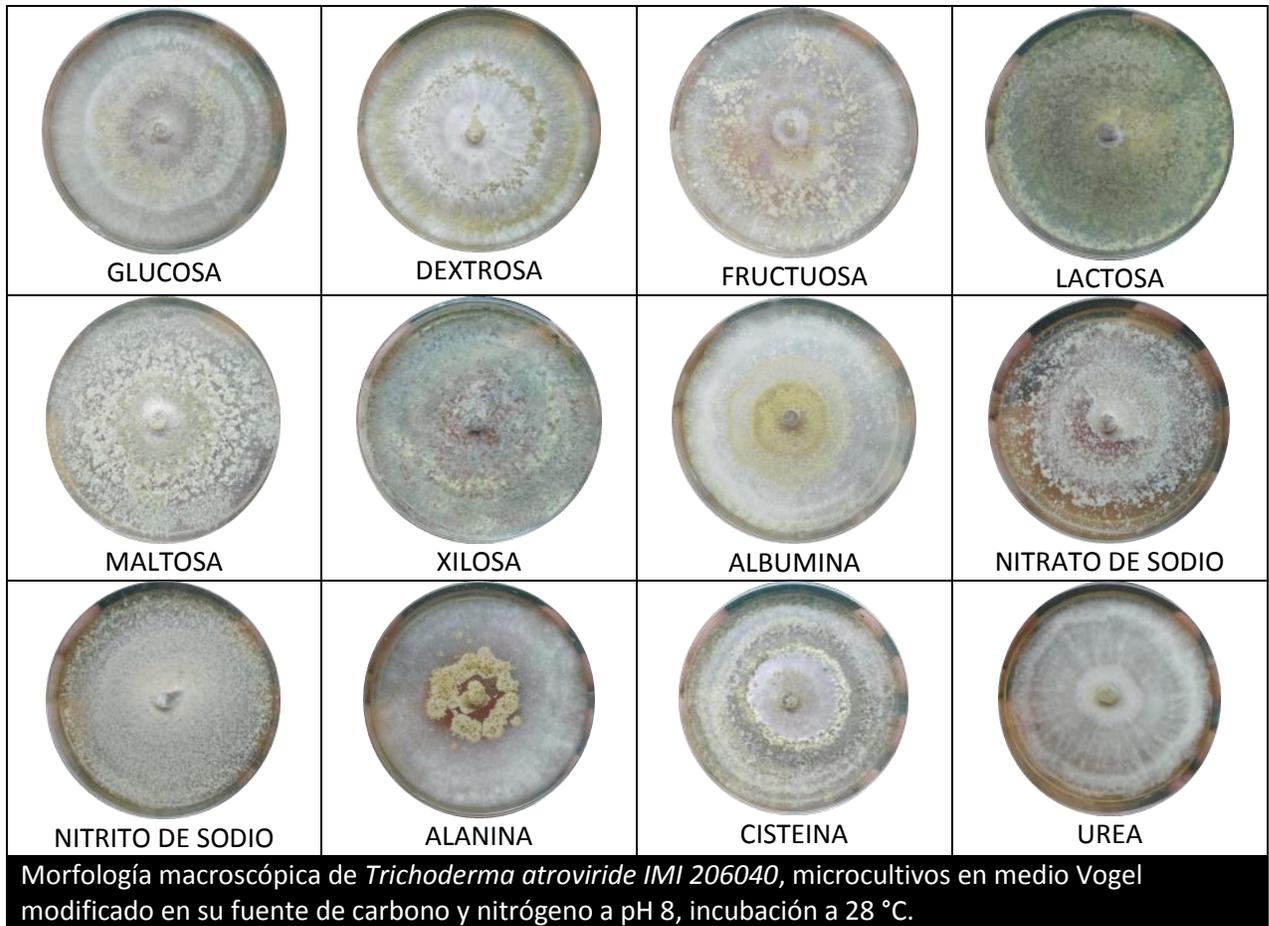
Morfología macroscópica de *Trichoderma atroviride* IMI 206040, microcultivos en medio Vogel modificado en su fuente de carbono y nitrógeno a pH sin modificar, incubación a 28 °C.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*



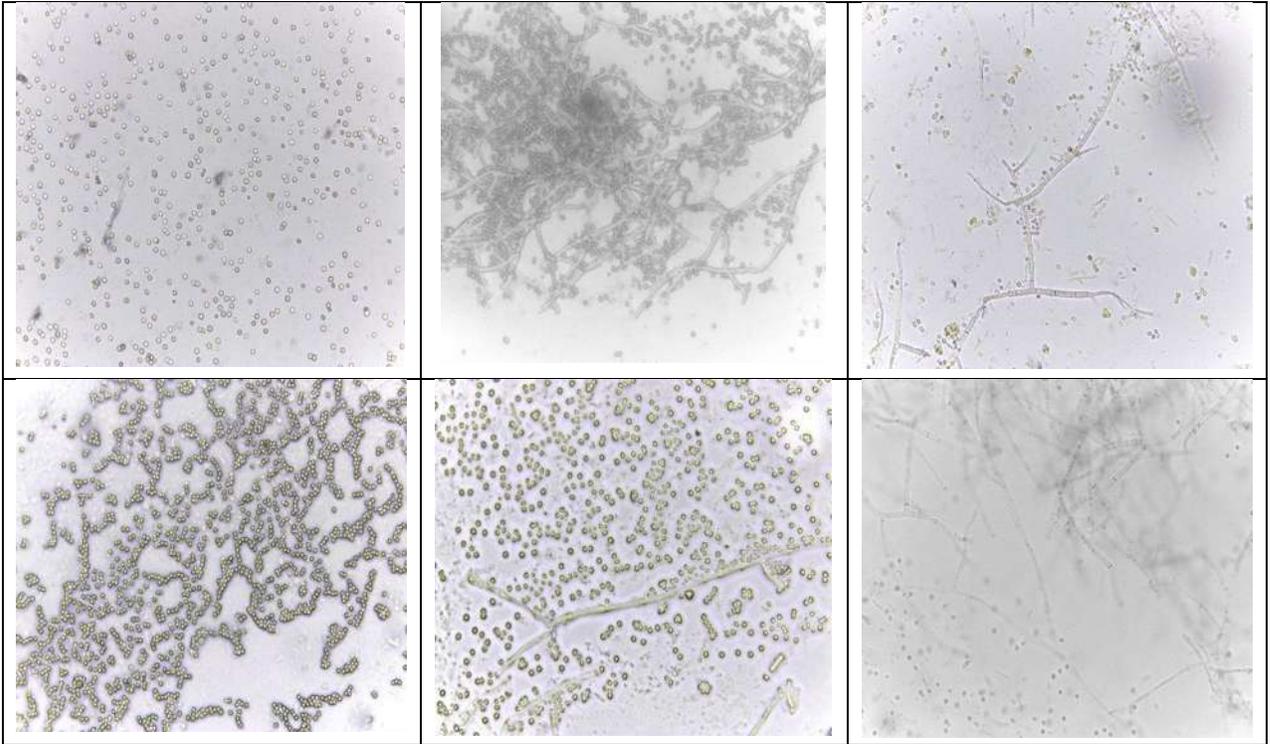
Morfología macroscópica de *Trichoderma atroviride* IMI 206040, microcultivos en medio Vogel modificado en su fuente de carbono y nitrógeno a pH 7, incubación a 28 °C.

EFFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE C Y N SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma spp.*



ANEXO IV

Morfología de las conidias de *Trichoderma atroviride*. Ejemplos representativos



Morfología de las conidias de *Trichoderma atroviride*.