



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS MEDIANTE
ELECTROFORESIS CAPILAR**

TRABAJO RECEPCIONAL EN LA MODALIDAD DE:

TESIS

PRESENTA:

PABLO FLORES CERVANTES


PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

ASESOR:

D.C. VIRGINIA ANGELICA ROBINSON FUENTES

Morelia, Michoacán, Noviembre del 2015



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

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 HONGOS.....	16
2.1.1 ESTRUCTURA.....	16
2.1.2 PARED CELULAR	17
2.1.3 REPRODUCCIÓN DE LOS HONGOS	20
2.1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS	21
2.1.5 HONGOS FITOPATÓGENOS	22
2.1.6 CARÁCTERÍSTICAS DE LOS HONGOS ESTUDIADOS.....	24
2.2 ELECTROFORESIS CAPILAR	29
2.2.1 ANCEDENTES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.....	29
2.2.2 FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFOREISI CAPILAR	30
2.2.3 COMPONENTES DE UN SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR	30
2.2.4 FACTORES QUE CAUSAN LA MOVILIDAD DEL ANALITO EN EL SISTEMA DE EC	31
2.2.7 BUFFERS	35
2.2.8 CARACTERIZACIÓN DE UN MICROORGANISMO POR ELECTROFORESIS CAPILAR	35
2.2.9 OTRAS APLICACIONES DE LA EC.....	36
III. JUSTIFICACIÓN	37
IV. HIPÓTESIS.....	38
V. OBJETIVOS.....	38
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	38
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	38
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	39
6.1. MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1.1 INSTRUMENTACIÓN.....	39
6.1.2 REACTIVOS	39
6.1.3 MEDIOS DE CULTIVO	40

6.1.4 CEPAS UTILIZADAS	40
6.1.5 CULTIVO	40
6.1.6 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO.....	40
6.1.7 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	41
6.1.7 BUFFER UTILIZADO.....	41
6.1.8 CONDICIONES ELECTROFORÉTICAS	41
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1 CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO	42
7.1.1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.....	42
7.1.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	51
c) Umbelopsis Umbelopsis vinacca (110).....	54
7.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO.....	57
Penicillium.....	57
Pochonia.....	57
Umbelopsis.....	58
Fusarium, Pestalotiopsis, cepa 172 y cepa 205.....	58
7.3 ELECTROFEROGRAMAS.....	60
7.3.1 ELECTROFEROGRAMAS DEL GÉNERO <i>Penicillium</i>	60
7.3.2 ELECTROFEROGRAMAS DEL GÉNERO <i>Pochonia</i>	61
7.3.3 ELECTROFEROGRAMAS DEL GÉNERO <i>Umbelopsis</i>	61
7.3.4 ELECTROFEROGRAMAS DE <i>F. oxysporum</i> , <i>Pestalotiopsis sp.</i> , cepa 172 y cepa 205.....	61
7.4 IDENTIFICACIÓN.....	63
7.4.1 RELACIÓN GENERAL DE LOS ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS CON LOS DIFERENTES GÉNEROS.....	64
7.4.2 RELACIÓN ENTRE LOS ELECTROFEROGRAMAS DE LOS DIFERENTES MEDIOS Y LOS DIFERENTES GÉNEROS.....	64
7.4.3 RELACIÓN DE LOS ELECTROFEROGRAMAS Y LOS DIFERENTES MEDIOS DE UN MISMO GÉNERO	65
7.4.4 RELACIÓN ENTRE LOS ELECTROFEROGRAMAS DE LOS DIFERENTES MEDIOS Y LAS DIFERENTES ESPECIES.....	69
7.4.5 RELACIÓN ENTRE LOS ELECTROFEROGRAMAS Y LOS DIFERENTES MEDIOS DE UNA MISMA ESPECIE.....	70
7.4.6 ELECTROFEROGRAMAS DE LAS CEPAS 172 Y LA 205	75
VIII. RESUMEN DE RESULTADOS	77

IX. CONCLUSIÓN.....	78
X. PERSPECTIVAS.....	78
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Num.	Descripción	Pag.
1	Tipos de micelio	17
2	Diagrama de la pared celular fúngica	18
3	Estructura de la quitina	18
4	Estructura del ergosterol	19
5	Estructura de la melanina	19
6	Morfología macro y microscópica de <i>Penicillium</i> sp.	24
7	<i>P. chlamydiospora</i> colonizando raíces de tomate	25
8	Morfología de <i>U. ramanniana</i>	26
9	Morfología de <i>Fusarium</i>	27
10	Morfología de <i>Pestalotiopsis palmarum</i>	28
11	Representación esquemática de un proceso de electroforesis	30
12	Esquema general de un equipo de EC	31
13	FEO doble capa de la interface formada entre la superficie de capilar y el buffer	32
14	Perfiles de flujo para los líquidos	33
15	Movilidad electroforética aparente	34
16	Crecimiento de <i>Penicillium pencasmium</i> 05-ICH 181	42
17	Crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. 23-AT 1812	43
18	Crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. SG-18 A18	43
19	Crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. SG-30 181	44
20	Crecimiento de <i>Penicillium lilacionoechinulatum</i> SG-39 1918	45
21	Crecimiento de <i>Pochonia</i> sp. 97	46
22	Crecimiento de <i>Pochonia</i> sp. 215	46
23	Crecimiento de <i>Umbelopsis</i> sp. 110	47
24	Crecimiento de <i>Umbelopsis</i> sp. 75	48
25	Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> 208	48
26	Crecimiento de <i>Pestalotiopsis</i> sp. 212	49
27	Crecimiento de Cepa Nombre clave 172	50
28	Crecimiento de Cepa Nombre clave 205	50
29	Micrografía de Conidias de <i>P. pencasmium</i> 05-ICH 181 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X	51
30	Micrografía de Conidias de <i>Penicillium</i> sp. 23-AT 1812 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X	52
31	Micrografía de Conidias de <i>Penicillium</i> sp. SG-18 A18 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X	52
32	Micrografía de Conidias de <i>Penicillium</i> sp. SG-30 181 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X	52
33	Micrografía de Conidias de <i>P. lilacionoechinulatum</i> SG-39 1918 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X	53
34	Micrografía de Conidias de <i>Pochonia</i> sp. 97 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X	53

35	Micrografía de Conidias de <i>Pochonia sp.</i> 215 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X	54
36	Micrografía de Conidias de <i>U. vinacca</i> 110 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X. (No conidio N.C.)	54
37	Micrografía de Conidias de <i>Umbelopsis sp.</i> 75 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X (No conidio N.C.)	55
38	Micrografía de Conidias de <i>F. oxysporum</i> 208 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X (No conidio N.C.)	55
39	Micrografía de Conidias de <i>Pestalotiopsis sp.</i> 212 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X (No conidio N.C.)	56
40	Micrografía de Conidias de la cepa 172 obtenidas en los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X	56
41	Micrografía de Conidias de la cepa 205 obtenidas de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X	56
42	A. efecto del buffer en voltaje negativo sobre señales de conidias B. separación individual y en mezcla en voltaje negativo	63
43	Electroferograma de las 5 cepas. Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h	64
44	Electroferogramas de las 5 cepas y los 4 medios diferentes.	65
45	Electroferogramas de los 4 medios correspondientes al género <i>Penicillium</i>	66
46	Electroferogramas de los 4 medios correspondientes al género <i>Pochonia</i>	66
47	Electroferogramas de los 3 medios correspondientes al género <i>Umbelopsis</i>	67
48	Electroferogramas de los 3 medios correspondientes al género <i>Pestalotiopsis</i>	67
49	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>Fusarium</i>	68
50	Electroferogramas de las 5 especies de <i>Penicillium</i> y los 4 medios diferentes	69
51	Electroferogramas de las dos especies de <i>Pochonia</i> la 215 y la 97 en los 4 medios diferentes.	70
52	Electroferogramas de las dos especies de <i>Umbelopsis</i> la 110 y la 75 en los 3 medios diferentes	70
53	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>P. pencasmium</i> 05-ICH 1918	71
54	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>Penicillium sp.</i> 23-AT 1812	71
55	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>Penicillium sp.</i> SG-18 A18	72
56	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>Penicillium sp.</i> SG-30 181	72
57	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>Penicillium sp.</i> SG-39 181	73

58	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>Pochonia</i> <i>sp.97</i>	73
59	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>Pochonia</i> <i>sp. 215</i>	74
60	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>Umbelopsis</i> <i>sp. 75</i>	74
61	Electroferogramas de los medios correspondientes al género <i>Umbelopsis</i> <i>sp. 110</i>	75
62	Electroferogramas de los medios correspondientes a la cepa 172	75
63	Electroferogramas de los medios correspondientes a la cepa 205	76

ÍNDICE DE TABLAS

Num.	Descripción	Pag.
1	Clase de hongos y sus esporas sexuales	21
2	Taxonomía de <i>Penicillium</i>	24
3	Taxonomía de <i>Pochonia</i>	25
4	Taxonomía de <i>Umbelopsis</i>	26
5	Taxonomía de <i>Fusarium</i>	27
6	Taxonomía de <i>Pestalotiopsis</i>	28
7	Acontecimientos de importancia de la EC	29
8	Tabla de reactivos utilizados	39
9	Cepas Utilizadas	40
10	Cinéticas de crecimiento y tiempo de conidiación de las cepas del género <i>Penicillium sp.</i>	57
11	Cinéticas de crecimiento y tiempo de conidiación de las cepas del género <i>Pochonia sp.</i>	58
12	Cinéticas de crecimiento y tiempo de conidiación de las cepas del género <i>Umbelopsis sp.</i>	58
13	Cinéticas de crecimiento y tiempo de conidiación de las cepas del género <i>F. Oxysporum</i> (208), <i>Pestalotiopsis sp.</i> (212) y dos cepas (172, 205)	59
14	Señales electroforéticas del género <i>Penicillium</i>	60
15	Señales electroforéticas del género <i>Pochonia</i>	61
16	Señales electroforéticas del género <i>Umbelopsis</i>	61
17	Señales electroforéticas presentes de las especies <i>F. oxysporum</i> (208), <i>Pestalotiopsis sp.</i> (212) y dos cepas la 172 y la 205	60

ABREVIATURAS

<i>EC</i>	Electroforesis Capilar
<i>HPLC</i>	Cromatografía de líquidos de alta presión
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>UV</i>	Ultra violeta
<i>FEO</i>	Flujo electroosmótico
<i>VMT</i>	Virus del mosaico del tabaco
<i>PDA</i>	Agar de dextrosa y papa
<i>MDA</i>	Agar extracto de malta
<i>MMV</i>	Medio mínimo Vogel

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo son filamentosos. De las 100.000 que se conocen cerca de 8.000 son fitopatógenos, es decir, son hongos que causan enfermedades en las plantas. Constituyen un grupo de mucha importancia en la agricultura debido a su gran número y enorme capacidad de reproducción. A nivel mundial los hongos fitopatógenos constituyen el grupo más importante desde el punto de vista económico en cuanto a su frecuencia de aparición y daño que pueden causar. La electroforesis capilar (EC) 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; en trabajos previos se observó una señal característica para cierto hongo por lo que se quiere establecer si esa señal electroforética se presenta en otras especies/géneros para que dicha técnica pueda servir como una alternativa para la identificación de células fúngicas.

OBJETIVO: Establecer las señales electroforéticas características de género y/o especie de diferentes especies fúngicas. **MATERIALES Y METODOS:** Medios de cultivo PDA, MDA, agar Sabouraud y medio mínimo Vogel, que se utilizaron para la siembra de 13 cepas de 5 géneros distintos (*Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pochonia* y *Umbelopsis*) proporcionados por el CMEB. Se utilizó un equipo de EC P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System Beckman Coulter® para llevar a cabo los corrimientos electroforéticos. Primeramente, se obtuvieron las cinéticas de crecimiento de todas las cepas en los cuatro medios de cultivo. Se anotó el tiempo de conidiación. Las conidias producidas se colectaron en un microtubo con agua estéril, se procesaron y finalmente se suspendieron en el buffer de corrimiento dejándolas reposar 24 h. Se mezclaron 400 µL del sobrenadante con 200 µL del buffer de corrimiento y la solución resultante se analizó por EC. La operación se repitió a las 48 h. Los análisis electroforéticos se realizaron a pH 6.8, pH 6.3 **RESULTADOS:** se presentaron diferencias morfológicas a nivel macroscópico en los 4 diferentes medios de cultivo y a nivel microscópico solo se presentaron ligeras diferencias en las conidias. Se encontró que las diferencias que se encontraron se debieron más que nada a la cepa que al medio de cultivo. Las mejores condiciones que en general obtuvieron las mejores señales fueron a 48 h con pH 6.8 para todas las cepas de ensayo. Por último para las señales cada género y cada especie presenta rasgos distintivos que tienen que ver con el medio en el que crecen. **CONCLUSIÓN:** Los sobrenadantes de suspensiones de las especies fúngicas estudiadas produjeron señales electroforéticas que supone la presencia de un componente de pared celular liberado en el medio. Las señales producidas sí están relacionadas con el género y la especie fúngica así como con el medio en el que crecen.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Fungi are microscopic, eukaryotic, branched and often filamentous organisms that produce spores. There are about 100,000 different species already described and only 8,000 are phytopathogenic, that is fungi that can cause plant diseases. Fungi are important in agriculture because they can damage crops which are important from the economical point of view. Capillary electrophoresis (CE) is a separation technique based on the migration of charged particles due to the action of an electric field; in previous works a characteristic electrophoretic signal was observed for certain fungus so it was decided to find out if that signal can be observed for other genus and species and if so, such signal can be used as an alternative for the identification of fungal cells. **OBJECTIVE:** To establish if certain electrophoretic signals can be specific of fungal genus and/or species. **MATERIALS AND METHODS:** Culture Media: PDA, MDA, Sabouraud and Vogel minimum medium, were used to promote growth of 13 strains from 5 different genus (*Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pochonia* and *Umbelopsis*) provided by the CMEB. For the electrophoretic experiments, a P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter®) was used. First, the growth kinetics of all strains were obtained in the four culture media and conidiation time was noted. Conidia produced were collected in a microtube with sterile water, processed and finally suspended in background electrolyte (BGE) leaving to stand for 24 hours. 400 µL of supernatant were mixed with 200 µL of fresh BGE and the resulting solution was analyzed by CE. The operation is repeated at 48 hours. Electrophoretic analysis were performed at pH 6.8, pH 6.3 **RESULTS:** morphological differences were present at microscopic level as a consequence of growing in 4 different culture media. Conidia showed only slight differences. It was found that the differences found were mostly due to the strain rather than the culture media. The best conditions and the best signals were obtained after 48 hours with BGE at pH 6.8 for all strains tested. Finally, signals have distinctive features, which are related to culture media rather than genus and/or species. **CONCLUSION:** The supernatants from suspensions of the fungal species studied, produced electrophoretic signals that reveal the presence of a cell wall component released into the medium. The signals produced are related to genus and fungal species as well as the culture media in which they grow.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos han estado en contacto con la humanidad desde su origen. A través de los años, éstos han tenido múltiples usos y fines, inicialmente como alimento, en el afán del ser humano por encontrar nuevas fuentes nutricionales, y quizá también como elementos de ornato. Hasta el siglo XVIII, los únicos hongos conocidos eran los macromicetos o setas, pero gracias a la creación del microscopio por Leeuwenhoek, se nos permitió observar al mundo no perceptible por el ojo humano, encontrando así el vasto grupo de los hongos microscópicos, de donde han obtenido múltiples beneficios, como por ejemplo, el desarrollo de alimentos y antibióticos, así como el reconocimiento de aquellos que son patógenos para el hombre, los animales, las plantas y los insectos [Bonifaz, 2012].

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo son filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa o ambos componentes. Se conocen cerca de 100.000 especies de las cuales la mayoría son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número las ocasiona en los animales. Sin embargo, alrededor de 8.000 son fitopatógenos. Por lo que el estudio de la fitopatología requiere un amplio conocimiento de micología [Agrios, 2005].

Los hongos que causan enfermedades en las plantas se denominan “fitopatógenos” (phyton: planta; pathos: enfermedad). Estos microorganismos constituyen un grupo de mucha importancia en la agricultura debido a su gran número y enorme capacidad de reproducción. Estos hongos ocasionan grandes pérdidas económicas, ya que los costos de producción aumentan al tener que establecer medidas para su control. A nivel mundial, los hongos fitopatógenos constituyen el grupo más importante desde el punto de vista económico en cuanto a su frecuencia de aparición y daño que pueden causar [Arauz, 1998]. Es por eso que se requiere de una identificación precisa, eficaz y económica, y una vez identificada la especie fúngica, se podrá iniciar con un tratamiento oportuno contra el patógeno de la planta.

La electroforesis capilar (EC) 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. En esta técnica se emplean capilares de sílice de 20 a 200 μm de diámetro para realizar separaciones de alta eficiencia de moléculas grandes y pequeñas. Las propiedades de separación y el consiguiente electroferograma tienen características que se asemejan a los geles de agarosa y poli(acrilamida) y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Con esta técnica es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas, ADN y sustancias no cargadas en forma simultánea, haciendo de la EC una de las herramientas más importantes y fundamentales en biología molecular y la medicina de diagnóstico [Castagnino, 2000 y Cázares, 2009]. Usando dicha técnica podemos llevar a cabo un análisis de los hongos fitopatógenos y así obtener una identificación precisa y rápida para llevar a cabo un tratamiento que sea oportuno. Recientemente, se han realizado estudios en los que se analizan conidias de *Trichoderma spp* mediante electroforesis

capilar (Cazares, 2009; Ávila, 2013; Salazar Alcantar, 2015; Salazar González, 2015). Se ha observado la presencia de una señal que puede usarse para caracterizar especies fúngicas, por lo que el análisis de este tipo de señales mediante EC se abordan en este trabajo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 HONGOS

Los hongos son organismos eucariontes no fotosintéticos con paredes celulares rígidas, núcleos organizados, cuya membrana nuclear está bien definida; son organismos aerobios, heterótrofos y en general no móviles; sin embargo, existen algunos hongos que poseen flagelos, como *Pythium insidiosum*. Son muy abundantes en la naturaleza y constituyen unos de los cinco reinos de los seres vivos, el reino Fungi (Bonifaz, 2012 y Bonifaz 1998). Dicho reino actualmente está conformado en los *phylum Chytridiomycota*, *Zigomycota* (hongos terrestres), *Ascomycota* (hongos de saco), *Deuteromycota* (hongos imperfectos) y *Basidiomycota* (hongos con sombrero); los primeros dos hongos inferiores, el resto hongos superiores [Mueller *et al.*, 2004 y Carlile *et al.*, 2006].

Los hongos son organismos productores de esporas, ramificados y a menudo filamentosos, las paredes celulares que los conforman contienen quitina, celulosa o ambos componentes. Es un grupo de organismos del cual se conocen alrededor de 100 000 especies pero se cree que hay más de un millón y medio, que viven en los medios más variados, de las especies conocidas solo alrededor de 100 son patógenos para los mamíferos. Sin embargo, más de 8 000 especies de hongos son patógenos para las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas [Agrios, 2005]. Los hongos tienen como característica común la ausencia de clorofila, por lo que no pueden realizar la fotosíntesis y deben nutrirse de materia orgánica ya elaborada; como requieren alimentarse de una fuente externa de nutrientes, éstos se consideran saprofitos (se alimentan de materia orgánica muerta o en descomposición), parásitos (se nutren de materia viva como lo son las plantas, animales, humanos e incluso insectos) y simbióticos (asociación entre un hongo y otro organismo para nutrirse mutuamente). La fuente primordial de nutrientes son las sales de nitrógeno y de carbohidratos (glucosa, sacarosa y maltosa) [Arenas, 2008].

Existen ciertas circunstancias óptimas de crecimiento para cada especie; generalmente los hongos crecen entre 0 y 55°C; un intervalo de temperatura ideal sería entre 20 y 30°C, sin embargo, algunos se encuentran viables a temperaturas de congelación y otros resisten hasta 55°C.

A diferencia de las bacterias, los hongos son acidófilos, es decir, crecen mejor entre pH 5.6 y 6.8. La humedad también es importante para su desarrollo, una humedad del 60-80 % favorece el crecimiento de la mayoría de los hongos filamentosos [Bonifaz, 2012].

2.1.1 ESTRUCTURA

La mayoría de los hongos están formados por estructuras filamentosas o elementos con múltiples células, por lo tanto, la unidad microscópica fundamental de los hongos se le denomina hifa o filamento, y al conjunto de éstas, micelio o talo; La hifa (fig. 1) es un tubo de longitud variada que está formado por una pared celular rígida en el que fluye el protoplasma, su diámetro puede ser

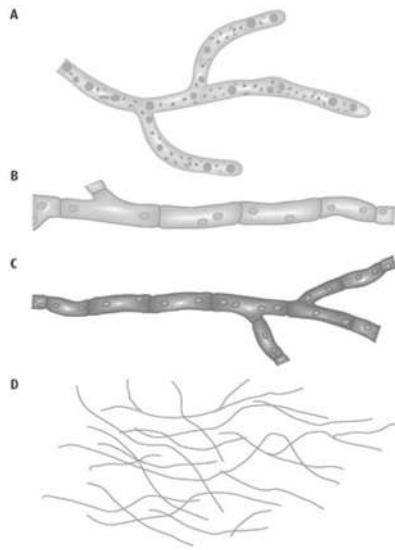


Figura 1: **A** Micelio macrosifonado hialino y cenocítico. **B** Micelio macrosifonado hialino y tabicado. **C** Micelio macrosifonado pigmentado y tabicado. **D** Micelio microsifonado. Fuente: Bonifaz, 2012

de 1 hasta 30 micras, el micelio tiene una longitud de tan solo unas cuantas micras pero en otros produce filamentos miceliales de varios metros de longitud.

En algunos hongos, el micelio está constituido por células que contienen uno o dos núcleos por célula. En otros el micelio es cenocítico, es decir, contiene muchos núcleos y está integrado por una célula multinucleada continua y tubular que puede o no ramificarse, o puede estar dividido por varias paredes transversales denominados septos, que forman el micelio tabicado, de ahí que cada segmento represente una hifa multinucleada [Agrios 2005].

Las hifas en función de sus diversas características físicas y funcionales se dividen en distintos grupos: Por su origen (Hifas verdaderas y Seudohifas), por su función (Micelio vegetativo o de nutrición y Micelio reproductivo o aéreo), por su morfología (Filamentoso o multicelular y Unicelular), por su diámetro (Micelio macrosifonado y Micelio microsifonado), por la ausencia o presencia de pigmentos (Micelio hialino y Micelio pigmentado) y finalmente por la presencia o ausencia de divisiones o septos (Micelio septado y Micelio cenocítico).

Los núcleos tienen doble membrana y nucleolo; dentro de los organelos ya mencionados que se encuentran en el citoplasma, también encontraremos inclusiones cristalinas (ergosterol), microcuerpos, puede haber hileras de microtúbulos y glucógeno. Cada tabique se encuentra relacionado con un corpúsculo de Woronin que actúa como obturador de los poros para aislar los compartimentos cuando éstos envejecen [Arenas, 2008].

2.1.2 PARED CELULAR

La pared celular es una estructura esencial para los hongos (fig. 2). La pared es una estructura específica de la célula fúngica y es muy diferente de la de las células vegetales compuesta fundamentalmente por celulosa. La pared fúngica está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Las paredes celulares fúngicas están formadas por diferentes capas: polisacáridos, como glucanos (polímeros de glucosa), mananos (polímeros de manosa) y polímeros de glucosamina; proteínas (permeasas); lípidos (ergosterol es un esteroles esencial); componentes fibrilares como la *quitina* y casi nunca celulosa, estos últimos junto con los glucanos y mananos dan gran rigidez a la pared [Bonifaz, 2012 y Arenas, 2008].

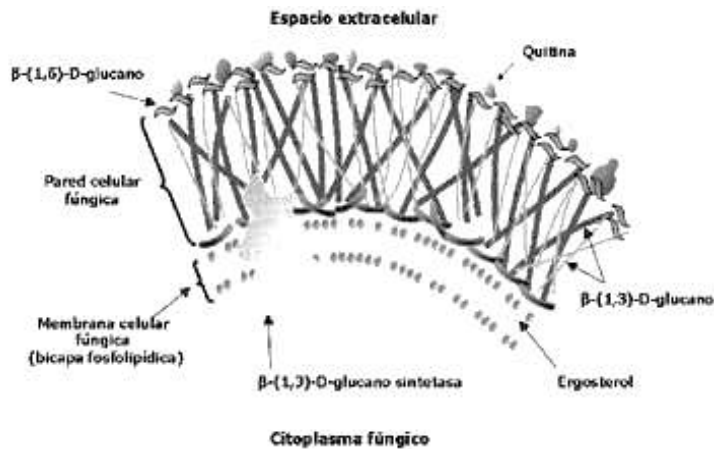


Figura 2. Diagrama de la pared celular fúngica
Fuente: Alexis, 2004

Glicoproteínas: las proteínas representan el 30-50% del peso seco de la pared fúngica en los hongos levaduriformes y el 20-30% en los hongos filamentosos. La mayoría de las proteínas están asociadas a glúcidos por O ó N, formando glicoproteínas [Pontón, 2008].

Quitina: (fig. 3) Está unida por puentes glucosídicos β 1-4, es altamente insoluble en agua y solventes orgánicos gracias a los enlaces de hidrogeno que presenta la molécula, la quitina se vuelve soluble en ácidos minerales diluidos. La quitina se sintetiza a partir de N-acetil glucosamina por la enzima quitin-sintetasa, que deposita los polímeros de quitina en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplasmática. El contenido de quitina de la pared fúngica varía según la fase morfológica del hongo. Representa el 1-2% del peso seco de la pared celular de las levaduras mientras que en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20% [Bonifaz, 2012; Arenas, 2008; Pontón, 2008].

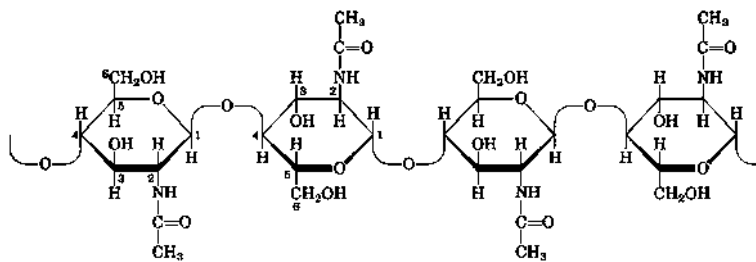


Figura 3. Quitina (N-acetil-D-glucosamida)
Fuente: InfoEscolar, 2015

Glucano: es el polisacárido estructural más importante de la pared y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90%), el β -1,3-D-glucano es el componente

estructuras más importante de la pared. El β -1,3-D-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, denominadas glucano sintetasas [Pontón, 2008].

Ergosterol: el *ergosterol* (fig. 4): éste es el similar al colesterol en la célula humana y fitoesterol en las plantas, el ergosterol se encuentra en casi todas las especies fúngicas, con algunas excepciones como el *Pneumocystis* spp. Este lípido da fluidez e integridad a la membrana, permite la función apropiada de muchas enzimas unidas a ellas, favorece la función de la quitina sintetasa y permite el crecimiento y división celular. Debido a que este lípido es una sustancia elemental en la conformación de la membrana celular fúngica, muchos antimicóticos actúan a nivel de su síntesis, dejando a la membrana defectuosa, con grandes espacios y poros, lo que culmina en la muerte celular fúngica [Bonifaz, 2012 y Arenas, 2008].

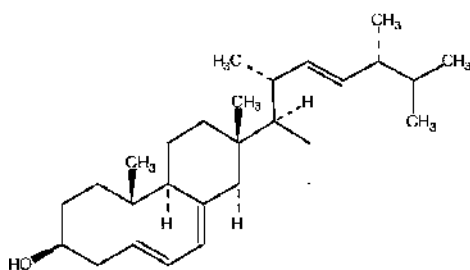


Figura 4. Estructura del Ergosterol
Fuente: Santa Cruz Biotechnology, 2015

Sin embargo, existen otros componentes de la pared, como lo son las glicoproteínas antigénicas, las adhesivas y las aglutinantes; y no menos importante la melanina, que es un pigmento aromático que se encuentra en la pared celular o matriz extracelular de los hongos. Protege ampliamente a los hongos de una serie de tensiones ambientales, incluyendo el calor y frío extremos, sequía, radiación UV, alta salinidad y metales pesados. La melanina (fig 5) se resiste a la descomposición probablemente debido a su compleja estructura aromática [Tresender, 2015]

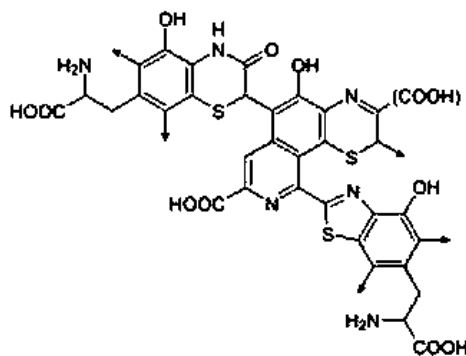


Figura 5. Estructura de la melanina
Fuente: Tresender, 2015

2.1.3 REPRODUCCIÓN DE LOS HONGOS

La reproducción de los hongos se realiza por medio de esporas y puede ser sexual (teleomorfa) o asexual (anamorfa), los hongos que presentan ambas formas se les llaman holomorfos. La reproducción sexual se produce por la unión de dos núcleos, en tanto que la asexual se da a partir de un micelio aéreo o reproductor, sin función de los núcleos. Hoy en día hay una tendencia taxonómica que indica que cuando se usa la palabra o terminación espóra (Gr. *spora* = semilla) se refiere a una forma de reproducción sexual, y conidio (también puede ser conidia por la traducción del inglés, término que proviene del griego *koni* = polvillo o polvo) si se trata de la anamórfica o asexual, algunos autores toman la palabra conidio o conidia como sinónimo de espóra; aunque esta tendencia tiene cada vez más aceptación, todavía existe controversia al respecto.

De cierta forma a los hongos que tienen una reproducción asexual se les denomina hongos mitospóricos, es decir, que su reproducción es a través de la mitosis y a los sexuales meiospóricos por que lo hacen por meiosis [Bonifaz, 2012 y Arenas, 2008].

A) REPRODUCCIÓN TELEOMÓRFICA (SEXUAL)

En la reproducción sexual el intercambio de material genético es el objetivo fundamental, por lo tanto su tendencia es la evolución y mejora de propiedades. La reproducción teleomórfica de los hongos es a través de tres procesos genéticos, los cuales se enumera a continuación:

1. Plasmogamia: mediante la unión de dos protoplasmas.
2. Cariogamia: por la fusión de dos núcleos.
3. Meiosis: división celular que da origen a células haploides, en ocasiones el proceso es seguido de una o más divisiones mitóticas.

Los hongos pueden ser heterotálicos u homotálicos para su reproducción sexual. En el caso de reproducción sexual heterotálica, un hongo debe tener sexo diferenciado (+ y -/ a y b / *major* y *minor*), de modo que se requiere la unión de dos hifas diferentes; por ejemplo la reproducción de zigosporas por *Rhizopus*, las ascosporas y basidiosporas (tabla 1). Y para la reproducción sexual homotálica, los hongos necesitan de un solo talo, en donde existen ambos núcleos diferenciados, *minor* (femenino) y *major* (masculino), los cuales son compatibles.

Para llevar a cabo el proceso de la reproducción sexual, los hongos así como otros organismos, producen feromonas, que facilitan el proceso de quimioatracción, en particular en la reproducción sexual heterotálica y producen cambios en las células receptoras. Las feromonas más importantes en dicho proceso de quimioatracción, son el anteridiol (ogoniol), sirenina, parisina y ácido tricospórico; siendo el anteridiol una feromona muy similar en su composición química a las feromonas sexuales de los animales.

Tabla 1: Clase de hongos y sus esporas sexuales

Clase	Esporas sexuales
<i>Ascomycetes</i>	<i>Ascosporas</i>
<i>Basidiomycetes</i>	<i>Basidiosporas</i>
<i>Zygomycetes</i>	<i>Zigosporas (Cigosporas)</i>

B) REPRODUCCIÓN ANAMÓRFICA (ASEXUAL)

El objetivo fundamental de la reproducción anamórfica es el mantenimiento de la especie, esto es debido a que se forman hongos genéticamente idénticos al progenitor, al no llevarse a cabo intercambio de material genético sino solamente mitosis. Suele llevarse a cabo por medio de esporas generadas por una célula especializada o conidiógena, las cuales son externas y se llaman conidios, y solo en los zigomicotas son internas y se llaman endosporas o esporangiosporas [Bonifaz, 2012].

Como ya se mencionó con anterioridad este tipo de reproducción es propio de los hongos mitospóricos, que solo efectúan mitosis. La reproducción asexual es muy sencilla y es la que realizan los hongos en su mayoría en condiciones normales y en los medios de cultivo; los conidios son el arma más accesible para su identificación rutinaria [Bonifaz, 2012; Arenas, 2008].

Clasificar los tipos de reproducción ha sido un problema desde los orígenes de la micología, muchas de las caracterizaciones son el resultado de la morfología, es decir, se basan en el tipo de estructura que se ve al microscopio óptico; sin embargo, es importante la cada forma de reproducción y su origen; así por ejemplo, dos hongos que tienen la misma estructura pudieron haberse originado de manera distinta [Bonifaz, 2012].

2.1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS

El reino de los hongos se encuentra dividido en cinco phylum o divisiones: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota.

Phylum Chytridiomycota: presentan células flageladas en su ciclo de vida (zoosporas) y se clasifican según la ultraestructura de las zoosporas. Poseen micelio cenocítico, talo holo o eucárpico. Presentan reproducción sexual y asexual gracias al esporangio. Sus paredes celulares se componen principalmente de quitina y glucano. Dentro del reino Fungi, los Chytridiomycetes son los únicos que presentan células móviles en su ciclo de vida.

Phylum Zygomycota: el nombre del grupo proviene de la presencia de una zigospora característica en parte de su ciclo. El micelio que presentan es cenocítico, producen esporas sexuales denominadas zigosporas que se desarrollan en el zigosporangio. Algunos tienen órganos de fijación denominados rizoides, como es el caso del *Rhizopus sp.* La pared celular que presentan está compuesta por quitina, quitosano y ácido poligalacturónico.

Phylum Ascomycota: los Ascomycetes están caracterizados por la presencia de una célula fértil, llamada célula ascógena, denominada asca. Sus hifas son septadas con un poro, a ambos lados del cual pueden observarse cuerpos de Woronin, poseen ascosporas dentro de las ascas, dicha asca proviene de un ascogonio y en general está dispuesta de una capa de células similares y en estructuras características denominadas cleistotecio, peritecio o apotecio. Principalmente sus paredes están compuestas por quinina.

Phylum Basidiomycota: división del reino que incluye a los hongos de mayor complejidad morfológica, entre los que figuran las conocidas setas, yesqueros, cuescos de lobo, carbonos, royas, hongos gelatinosos etc. este grupo se caracteriza por presentar basidiosporas que se producen en basidios, la forma del basidio es crucial en la clasificación, los que tienen septos se clasifican en Phragmobasidiomycetes y aquellos sin septos en Homobasidiomycetes. El cuerpo fructífero sexual que presentan se denomina basidiocarpio, sus hifas son septadas y los septos simples o con doliporos [Agrio, 2005; Arias y Piñeros, 2008; Rivera, 2007].

Phylum Glomeromycota: es una división del reino que comprende un grupo prácticamente desconocidos, son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres. Este grupo de hongos son simbioses mutualistas que forman micorrizas arbusculares (simbiosis mutualista entre un hongo y las raíces de una planta). El hongo recibe hidratos de carbono de la planta a cambio de que funcione como un sistema de raíces extendidas de tal modo que mejora la absorción de minerales por las raíces de las plantas. Esta división cuenta actualmente con 150 especies descritas, distribuidas en diez géneros, son simbioses obligados, forman arbusculos en raíces de las plantas, generan esporas grandes y multinucleadas con paredes en capas y poseen hifas no septadas [Scribd, 2011].

2.1.5 HONGOS FITOPATÓGENOS

Los hongos que causan enfermedades en las plantas se denominan "fitopatógenos" (phyton: planta; pathos: enfermedad). Estos microorganismos constituyen un grupo de mucha importancia en la agricultura debido a su abundancia y enorme capacidad de reproducción, por lo que con frecuencia dificulta su control. Estos hongos ocasionan grandes pérdidas económicas. Aumentan los costos de producción al tener que establecer medidas para tratar de controlarlos. A nivel mundial los hongos fitopatógenos constituyen el grupo más importante desde el punto de vista económico en cuanto a su frecuencia de aparición y el daño que pueden causar [García, 2004].

Se considera que existen más de 100 mil especies de hongos, de los cuales la mayoría son estrictamente saprofitos y viven sobre la materia orgánica muerta a la que descomponen. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número afecta a los animales, la mayoría de las cuales son enfermedades superficiales de la piel. Sin embargo, más de 8 mil especies de hongos producen enfermedades en las plantas, la mayoría

de las plantas pueden ser atacadas por algún tipo de hongo (por uno o varios) y también un mismo hongo fitopatógeno puede infectar a uno o más tipos de plantas [Agrios, 2005].

La mayor parte de los hongos fitopatógenos pasan la mayoría de su ciclo de vida en la planta que les sirve de huésped (como parásitos) y otra parte en el suelo, en los residuos vegetales que se encuentran ahí (como saprofitos), aunque algunos solo se desarrollan como parásitos. Generalmente, los cuerpos reproductores del hongo se forman en la superficie de los tejidos de la planta huésped (o muy cerca de ella), lo cual causa que las esporas se dispersen rápida y fácilmente [García, 2004].

Los efectos que producen los hongos en las plantas pueden ser de tipo local, cuando afectan una porción pequeña del tejido, o puede ser general, si éste causa un daño completo a toda la planta, esto depende también de a qué tipo de planta parasiten. El daño producido por los hongos es principalmente, una muerte del tejido (necrosis) que afectan. También es posible que produzcan una atrofia a la planta completa o de alguna de sus partes y en otros casos puede producir crecimiento excesivo (hipertrofia). Los hongos que afectan la raíz, o bien el sistema vascular de la planta, tienden a producir color amarillo en la planta y marchitez, lo que es conocido como clorosis de la planta [García, 2004].

a) IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS

Las plantas sufren una serie de enfermedades y plagas durante su crecimiento. Los hongos no son la excepción, ya que manchan, desfiguran o incluso causan la podredumbre no solo del fruto, sino también de la planta, a consecuencia de esto se ve afectado el valor en el mercado. Las pérdidas económicas causadas por hongos fitopatógenos son considerablemente altas, los hongos como *Penicillium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Pestalotiopsis* y *Rhizopus* son hongos fitopatógenos que afectan a cultivos de alta importancia económica, anualmente se aplican miles de toneladas de agroquímicos, ante la necesidad de establecer un control.

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son los causantes de enfermedades pre y poscosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo éstos responsables de pérdidas económicas cuantiosas; Se estima que entre el 5 y el 25% están presentes en países desarrollados y del 20 al 50% en países en desarrollo. El daño ocasionado no sólo se refiere a las pérdidas de producción económicas, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos. Los patógenos más importantes que causan elevadas pérdidas de frutas y hortalizas son normalmente las bacterias y los hongos, sin embargo, con mayor frecuencia son especies de hongos las causantes del deterioro patológico de frutas, hojas, tallos y productos subterráneos (raíces, tubérculos, cormos, etc.) [Agrios, 2005]. Mecanismo consiste en la excreción por parte del hongo de enzimas tales como cutinasas y esterases que alteran la superficie vegetal facilitando la adherencia [Rivera y Codina, 2015].

2.1.6 CARÁCTERÍSTICAS DE LOS HONGOS ESTUDIADOS

Penicillium sp.

Penicillium es el género de hongos más abundante que puede encontrarse casi por todas partes en suelo, en vegetación caída y en el aire. La fácil proliferación de *Penicillium* en los alimentos es un problema, algunas especies producen toxinas, sin embargo muchas especies de este hongo son benéficas para los seres humanos. El género *Penicillium* incluye más de 300 especies, una de las más conocidas es *P. chrysogenum* que es la productora de la penicilina [EcuRed, 2015].

Morfología: *Penicillium sp* es un hongo de crecimiento rápido dando inicialmente colonias blancas, las cuales se cubren con las esporas y según la especie van tomando diferentes colores; verde azules, gris verdosas, gris oliva, amarillentas o rosadas con el tiempo, principalmente colonias verdosas; las colonias pueden ser de textura filamentosa, vellosas, lanosas o de textura algodonosa [Guzmán, 1977].

Las especies de *Penicillium* presentan Hifas septadas hialinas (1.5-5 μ de diámetro), con conidióforos simples o ramificados, métulas, fiálides y conidias. Las métulas son ramificaciones secundarias que se forman sobre los conidióforos. La organización de la fialides en la punta de los conidióforos es típica (llamadas “penicilli” o pincel). Las conidias, van de 2.5-5 μ de diámetro, son redondas, unicelulares y observadas como cadenas no ramificadas en el extremo de las fiálides [Fundación Bioquímica Argentina, 2015].

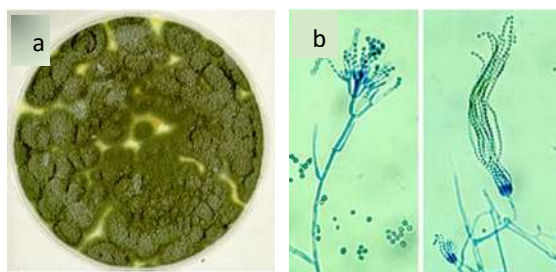


Figura 6. Morfología macro y microscópica de *Penicillium sp*
a. Características macrosocópicas. b. Características microscópicas de *P. verrucosum* a la izq. Y *P. cheresanum* a la der. Fuente: Universidad de Adelaide, 2006.

Taxonomía

Tabla 2. Taxonomía de *Penicillium*

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Eurotiomycetes</i>
Subclase	<i>Eurotiomycetidae</i>
Orden	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Trichonomaceae</i>
Género	<i>Penicillium</i>

Fuente: CABI, 2015

Pochonia sp.

Pochonia es un género de hongos dentro del orden Hypocreales y se describe como anamórfico Metacordyceps. En dicho género se encuentran diversas especies y una de las más importantes es *P. chlamydosporia*. Es un hongo del suelo generalizado, distribuido en todo el mundo en suelos supresores de nematodos, ya que este hongo se utiliza como un agente de control biológico prometedor para agallador y nemátodos del quiste [Runmao Lin *et al.*, 2015; Elaine sala *et al.*, 2012].

Morfología: Las colonias de este género de hongos son de crecimiento rápido, alcanzando de 15-40 mm de diámetro en 10 días. Las colonias inicialmente son de color blanco y con el paso del tiempo éstas viran a una coloración crema, amarilla y café dependiendo de la especie, de aspecto polvoriento, al reverso suelen ser de una coloración amarilla, naranja, café e incluso roja, éstos según la especie. Los conidióforos generalmente son postrados y se diferencian poco de las hifas vegetativas, pero a veces son erectos y diferenciados. Las fiálides conidiógenas son estrechas con punta estrecha por lo que el engrosamiento de la pared periclinal es apenas visible. Las conidias se adhieren en las cabezas globosas o cadenas subglobosas, elipsoidal en forma de vara, isodiamétricas-poliédricas con extremos romos. Las dictioclamidosporas son producidas en la superficie de la colonia o sumergido en él, tridimensionales, pluricelulares, engruesan con el tiempo y por lo general se forman en tallos cortos [Zare, *et al.*, 2001].

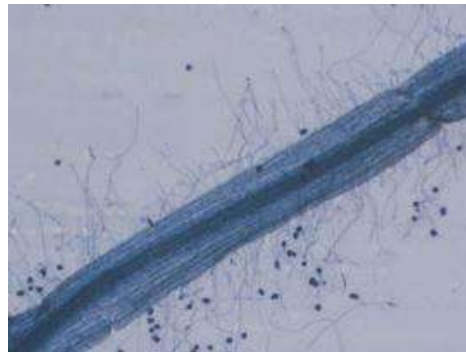


Figura 7. *P. chlamydosporia* colonizando raíces de tomate
(Los puntos oscuros son los clamidóporos). Fuente: PROMIP, 2011

Taxonomía

Tabla 3. Taxonomía de *Pochonia*

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Subclase	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Clavicipitaceae</i>
Género	<i>Pochonia</i>

Fuente: CABI. 2015

Umbelopsis sp.

El género *Umbelopsis* se clasificó dentro de los Deuteromycetes por Amos y Barnett en 1966. Von Arx propuso que este género se clasificara en Zygomycetes en 1982. Meyer y Gams eligieron la familia Umbelopsidaceae de Mucorales para acogerle en 2003. Hasta el momento, 15 especies han sido descritas en este género, 13 de los cuales han sido aceptados por Meyer y Gams [Wang *et al.*, 2013].

Morfología: Los miembros de este género crecen lentamente y forman una capa aterciopelada de coloración blanca a marrón amarillenta o rojiza, el reverso de coloración grisácea dependiendo de la especie. El micelio mayormente superficial, compuesto por septos escasamente ramificados, hifas hialinas que irradian una coloración marrón, de 2.3 a 8.5 micras de ancho. Los esporangios son globosos que van de 7-10 micras de diámetro. Esporangióforos erectos, hialinos, ramificados, un poco hinchados en la base, 88-277 x 2,3-9 micras, se estrecha en la punta, 1,5-3 micras, dejando una columnilla menos distinta y collar. Esporangiosporas hialinas, globosas o subglobosas, de 2,5-3 micras de diámetro y las clamidosporas son globosas y subglobosas de 30 a 40 micras de diámetro [Ya-ning Wang *et al.*, 2013].

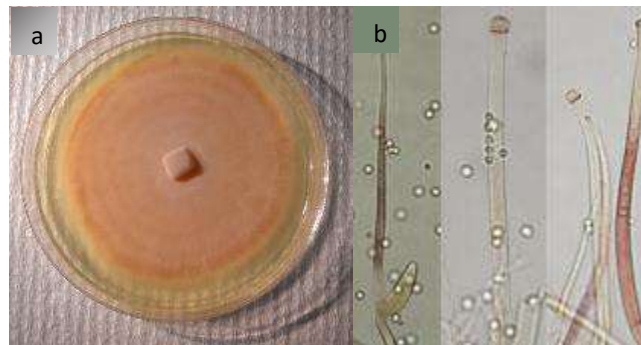


Figura 8. Morfología de *U. ramanniana*

a. Morfología colonial. b. Morfología microscópica

Fuente: a. Andrii Gyganskyi, 2014 y b. Alena Kubátová, 2014

Taxonomía

Tabla 4. Taxonomía de *Umbelopsis*

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Zygomycota</i>
Clase	<i>Zygomycetes</i>
Subclase	<i>Mucoromycotidae</i>
Orden	<i>Mucorales</i>
Familia	<i>Umbelopsidaceae</i>
Género	<i>Umbelopsis</i>

Fuente: CABI, 2015

Fusarium sp.

Este grupo de hongos crece dando una colonia blanca la cual produce un pigmento color violeta que gradualmente se difunde en el medio y a medida que envejece se tornan más fuertes (fig 9). El micelio está formado por hifas septadas y los conidióforos presentan racimos de macroconidios [Guzmán, 1977].

Algunas especies de este género son de interés agrícola como lo es el *Fusarium oxysporum*, causante de diversas enfermedades en distintos cultivos como la marchitez en algodón, el mal de Panamá en el banano, podredumbre basal en frijol, marchitez de las Cucurbitáceas, marchitez y pudrición de la corona en el Jitomate, entre muchas otras más [Finch y Finch, 1997].

Morfología: Después de 4 días de crecimiento en el agar el diámetro de la colonia es alrededor de los 5,4 cm, presenta Microconidios abundantes con un tamaño de 8,7-12,5 x 2,5-3,1 μm , con uno o dos septos, ligeramente curvados, con extremos redondeados. Macroconidios fusiformes, de 24-25 x 3-3,5 μm ligeramente curvados con 4 a 5 septos (fig 9). Fiálides en su mayoría cortas. Clamidosporas presentes y abundantes tanto intercalares como apicales de 12,5 a 16 μm [Vera, 2007].

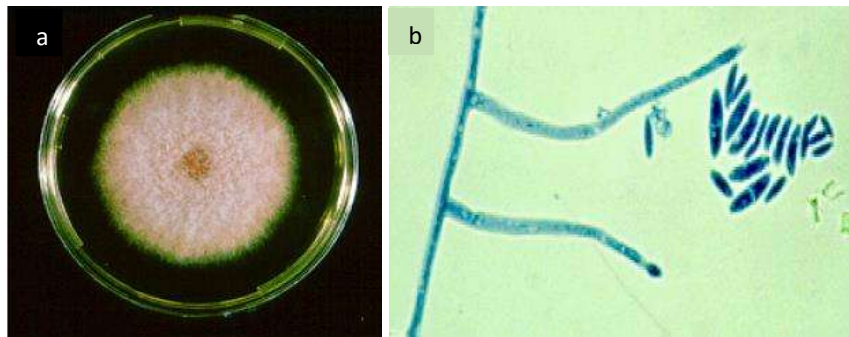


Figura 9: Morfología de *Fusarium sp.*

a. Características macroscópicas de *Fusarium sp.* b. Características microscópicas de *Fusarium solani*. Fuente: Universidad de Adelaide, 2006

Taxonomía

Tabla 5. Taxonomía de *Fusarium*

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Subclase	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Nectriaceae</i>
Género	<i>Fusarium</i>

Fuente: CABI, 2015

Pestalotiopsis sp.

Este género está ampliamente distribuido en el mundo, teniendo una amplia gama de sustratos. Muchas de sus especies son patógenas de plantas y algunos son saprobitos en el suelo y en restos de plantas. Especies de *Pestalotiopsis* endofíticas a menudo han sido reportadas y consideradas como parte principal de la comunidad de *Pestalotiopsis* en la naturaleza. El género *Pestalotiopsis* fue establecido por Steyaert tras una modificación taxonómica al género *Pestaloptia*. El género *Pestaloptia* está restringido a una sola especie y reasignado algunas especies anteriormente dispuestas en *Pestalotia* a los géneros anamorficos nuevos *Pestalotiopsis* y *Truncatella* [Wei et al., 2007].

Morfología: Las conidias del género *Pestalotiopsis* son fragmosporas, es decir macroconidios de septos transversales, son de color café a negro con las células de los extremos hialinas y con sétulas. Se desarrollan en un cuerpo fructífero que se denomina acérvulo. En el cultivo se observa un micelio algodonoso blanco con un punteado negro que corresponde a los acérvulos los cuales aparecen después de 7 días de incubación [Ulloa, 1978].

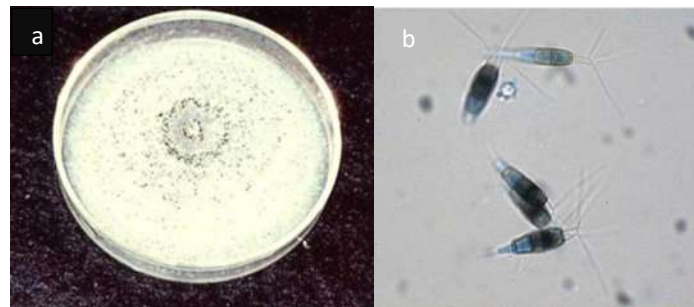


Figura 10. Morfología de *Pestalotiopsis palmarum*
a. Morfología colonial en medio PDA. b. Conidios. Fuente: Labarca et al., 2007

Taxonomía

Tabla 6. Taxonomía de *Pestalotiopsis*

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Subclase	<i>Xylariomycetidae</i>
Orden	<i>Xylariales</i>
Familia	<i>Amphisphaeriaceae</i>
Género	<i>Pestalotiopsis</i>

Fuente: CABI, 2015

2.2 ELECTROFORESIS CAPILAR

2.2.1 ANTECEDENTES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

A través de los años en la historia se han desarrollado descubrimientos importantes, desde nuestros antepasados con la creación de herramientas de caza, hasta la época actual llena de aparatos electrónicos de la era digital, tal es el caso de la electroforesis capilar (EC) la cual no queda exenta a estos hallazgos ya que a comienzos del siglo XIX se concretaron avances que llevan a la creación de dicho método. A continuación en la tabla 7 se muestran los antecedentes de la técnica.

Tabla 7. Acontecimientos de importancia de la EC

1809	<i>Reuss</i> reporta el desplazamiento de partículas de sílice bajo acción de un campo eléctrico aplicado en arena (Memorias de la Sociedad Imperial Natural).
1816	<i>Porret</i> observa el transporte de agua hacia el polo negativo por acción de corriente galvánica generada por la polarización negativa del capilar que une los 2 recipientes electródicos, a este fenómeno ahora se le conoce como flujo electroosmótico (FEO).
1937	<i>Arne W. Kaurin Tiselius</i> (Premio Nobel de Química 1948) utiliza electroforesis en medio libre empleando un tubo de vidrio con lo que separara proteínas en mezcla, se presentaron problemas de difusión térmica y convección, por eso a partir de entonces se optó por realizar electroforesis en medios anticonvectivos como la agarosa y poliacrilamida.
1963	<i>Konstantinov, Oshukiva y Evereast</i> en 1964 realizan varios trabajos de investigación empleando capilares y realizan la medición por absorción UV.
1967	<i>Hjerten</i> emplea capilares milimétricos para la separación de sustancias neutras y sustancias cargadas eléctricamente.
1969	<i>Virtaen y Mikkers</i> desarrollan separaciones electroforéticas con capilares de 200 μm de diámetro interno (di) en vidrio y teflón respectivamente.
1980	<i>Jorgenson y Lukacs</i> logran elaborar capilares de sílice fundida de 75 μm de diámetro interno (di), aplicaron voltajes elevados de 20-30 kV, controlando el calor con aire frío en el exterior del capilar, fue el inicio de la EC.

Fuente: Avila, 2013 y Cázares, 2011

2.2.2 FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFORESI CAPILAR

La electroforesis es un método de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de especies cargadas dentro de un campo eléctrico de corriente directa. La EC se define como el movimiento de partículas o moléculas cargadas en un medio líquido que por lo general es acuoso que a su vez es producido por la influencia de un campo eléctrico [Douglas *et al.*, 2008].

El fenómeno de electroforesis se lleva a cabo al aplicar un campo eléctrico en los extremos de un tubo de capilar lleno de una disolución tampón o electrolito de separación, gracias a la conductividad que éste genera se produce una diferencia de potencial entre los extremos del capilar dando lugar a la aparición de un flujo de disolución (fig 11). La electroforesis en macroescala se aplica a una diversidad de problemas de separación analítica difíciles: aniones y cationes inorgánicos, aminoácidos, catecoláminas, fármacos, vitaminas, carbohidratos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos y otras numerosas especies. Una ventaja especial de la electroforesis es su capacidad única de separar macromoléculas cargadas de interés en la investigación bioquímica, biológica y biomédica y en la industria biotecnológica. La detección se realiza mediante la lectura de la absorbancia en la región UV-Visible, por medio de lámparas de emisión discreta. La EC es muy sencilla de automatizar, es precisa para el análisis cualitativo y cuantitativo, bajo consumo de reactivos por lo que el método es económico y además posee una facilidad de empleo [Sierra *et al.*, 2010 y Douglas *et al.*, 2008].

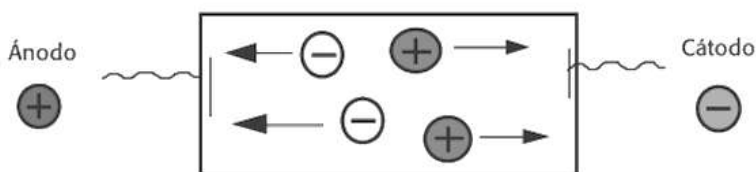


Figura 11. Representación esquemática de un proceso de electroforesis. Fuente: Sierra *et al.*, 2010

2.2.3 COMPONENTES DE UN SISTEMA DE ELECTROFORESI CAPILAR

La instrumentación general de un aparato de electroforesis capilar es bastante sencillo (fig. 12), básicamente consta de un tubo capilar de sílice con una ventana visible, dos viales que contengan el electrolito de separación o buffer, una fuente de alto voltaje que proporciona hasta 50 kV, dos electrodos de platino que están conectados a la fuente de voltaje, un detector (UV-vis) alineado a la ventana del capilar y un sistema de administración de datos [Hernández, 2006; Cázares, 2007].

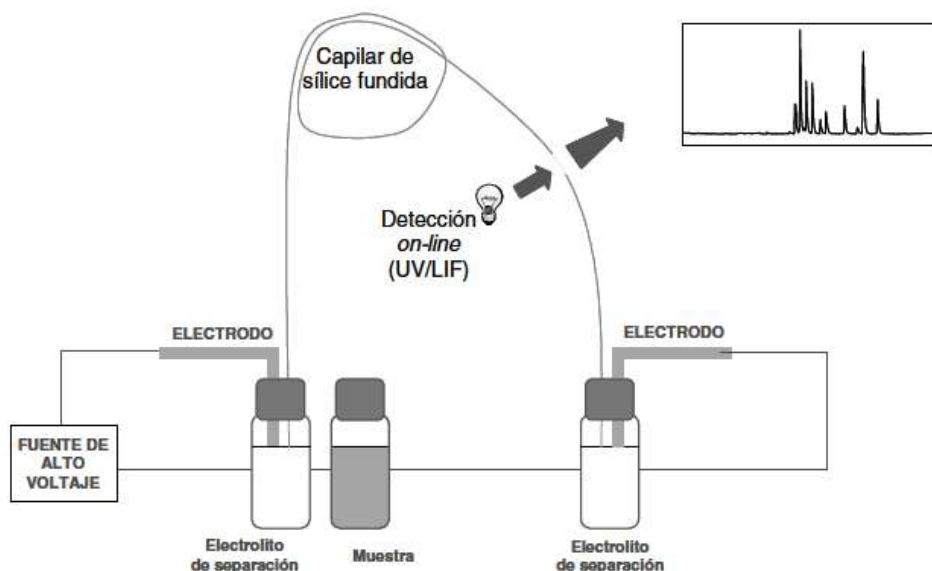


Figura 12. Esquema general de un equipo de EC

Fuente: Hernández, 2006

Los viales de entrada y de salida contienen el buffer de separación. En dichos viales se introducen los extremos del capilar de diámetro interno no mayor a 200 μm , que mediante una diferencia de presión se rellena con el buffer. Una vez relleno con el buffer, se introduce el extremo del capilar de entrada en el vial de muestra para llevar a cabo la introducción de ésta. La inyección de la muestra en el capilar se puede realizar mediante dos formas, por inyección hidrodinámica (presión externa) estableciendo una diferencia de presión o por inyección electrocinética (campo eléctrico) mediante la aplicación de voltaje. Se introducen los electrodos al momento de cada inyección, el positivo (ánodo) en el de entrada y el negativo (cátodo) en el de salida, siempre que se trabaje a polaridad normal. Los electrodos están conectados a una fuente de alto voltaje, que genera potenciales de hasta 60 kV. El capilar tiene una ventana de detección, una zona sin el recubrimiento de sílice que permite la transmisión de la señal que llegará al detector, el detector se encuentra acoplado a la ventana de detección de manera que detecta los diferentes compuestos separados por electroforesis a medida que van pasando por dicha ventana. Las señales que el detector percibe son transmitidas al sistema de administración de datos las cuales son traducidas a los denominados electroferogramas [Casado, 2014].

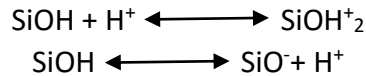
2.2.4 FACTORES QUE CAUSAN LA MOVILIDAD DEL ANALITO EN EL SISTEMA DE EC

a) FLUJO ELECTROOSMÓTICO (FEO)

La electroósmosis (FEO) puede describirse como el movimiento relativo de un líquido con respecto a una superficie cargada bajo la acción de un campo eléctrico. El FEO se puede explicar mediante la teoría de la doble capa, según la cual, en la interface entre un sólido y un líquido se

puede formar una doble capa de iones debido a dos fenómenos distintos (fig 13). Por un lado, a la adsorción específica de iones de la disolución sobre la superficie sólida y, por otro, debido a que la superficie sólida por su naturaleza se ioniza al estar en contacto con la disolución [Sierra *et al.*, 2010].

En la EC los capilares más utilizados son de sílice fundida y presentan grupos silanol (Si-OH) en su superficie que pueden ser ionizados en función del pH del buffer, formando así grupos cargados positiva (Si-OH⁺₂) o negativamente (Si-O⁻) según las siguientes reacciones:



Una doble capa eléctrica se forma en la pared del capilar. Una capa inmóvil fuertemente adsorbida de cationes adyacente a la superficie negativa neutraliza parcialmente la carga negativa. El resto de la carga negativa se neutraliza por un exceso de cationes solvatados por la fase móvil (buffer) en la doble capa de la disolución próxima a la pared. El grosor de la capa móvil va de 10 nm cuando la fuerza iónica es 1mM 0.3 nm cuando la fuerza iónica es 1 mM 0.3 nm cuando la fuerza iónica es 1 M. Los cationes mantienen el balance de cargas, a lo que se conoce como potencial Z. En un campo eléctrico los cationes son atraídos por el cátodo y a los aniones por el ánodo transportando agua con ellos. Por consiguiente, la doble capa eléctrica tiene un balance que está a su vez en equilibrio con la pared, que corresponde al potencial Z.

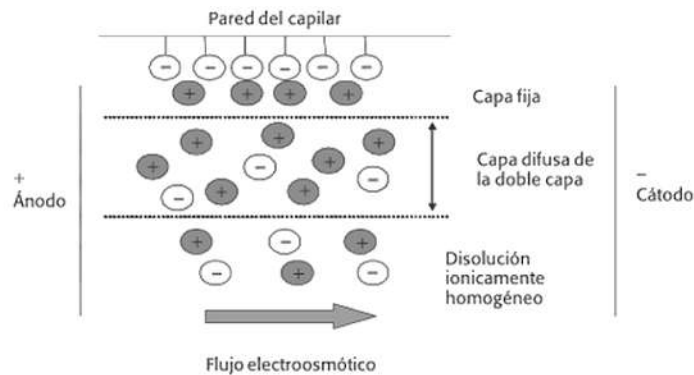


Figura 13. FEO doble capa de la interface formada entre la superficie del capilar y el buffer

Fuente: Hernández, 2006

El exceso de cationes en la parte difusa (móvil) de la doble capa confiere un momento neto hacia el cátodo. Esta acción de bombeo, llamada electroósmosis o bien electroendoósmosis, es impulsada por los cationes solvatados que se encuentran en la franja de 10 nm cerca de las paredes y crea una especie de frente uniforme de *flujo electroosmótico* (fig 4) de toda la disolución hacia el cátodo, es decir, se da un fuerte contraste con el *flujo hidrodinámico* (fig 14) ordinario, que es impulsado por una diferencia de presión entre los extremos del capilar. En el flujo hidrodinámico, el perfil de velocidades a través de una sección transversal del fluido es

parabólico: la velocidad es máxima en el centro y disminuye totalmente en las paredes del capilar. Dicho gradiente de velocidad nos da como resultado un considerable ensanchamiento de banda [Cazares, 2007].

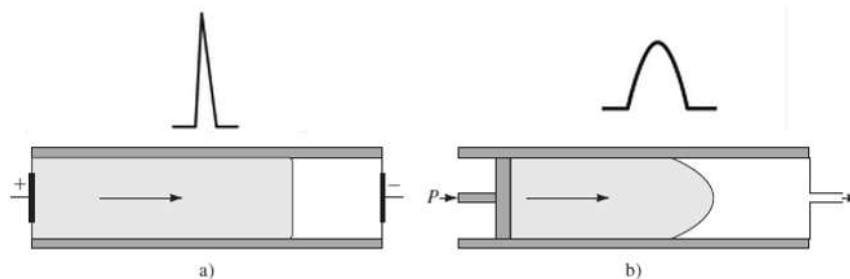


Figura 14: Perfiles de flujo para los líquidos: a) Flujo laminar b) Flujo electroosmótico

Fuente: Douglas *et al.*, 2008

La movilidad electroosmótica o flujo electroosmótico está definido por:

$$\mu_{eo} = \frac{\zeta \epsilon}{4\pi\eta} E = \mu_{eo} \quad (1)$$

Donde ϵ es la constante dieléctrica, η es la viscosidad del buffer y ζ es el potencial zeta medido al nivel de corte cercano a la interfase líquido-sólido. El potencial Z es relacionado a la inversa de la carga por unidad de superficie, el número de balance de electrones y la raíz cuadrada de la concentración del electrolito. Existe una relación inversa, al incrementar la concentración del electrolito se reduce la FEO.

El pH controla la FEO, a pH neutro a alcalino, la FEO es lo suficientemente fuerte que la migración electroforética hace que todas las especies sean barridas hacia electrodo negativo. La FEO hace posible el análisis simultáneo de cationes, aniones y especies neutras en un solo análisis. Siendo el orden de migración: cationes, especies neutras y aniones [Cázares, 2007].

b) MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EPM)

Bajo la acción de un campo eléctrico, los solutos iónicos se desplazan a través del capilar debido a dos razones: por un lado, ya se comentó que el FEO arrastra todo el seno de la disolución y por tanto, también solutos iónicos. Por otro lado, la propia carga de un soluto que ésta muestre una movilidad por sí mismo, llamada movilidad electroforética. La velocidad de migración de un ion sometido a la acción de un campo eléctrico, es:

$$v = \mu_{ep} E \quad (2)$$

Siendo μ_{ep} la movilidad electroforética de ion y E , la intensidad del campo eléctrico aplicado. La movilidad electroforética, depende a su vez de la carga del analito (q), de su radio (r) y de la viscosidad de la solución (η), según la expresión:

$$\mu_{ep} = q / 6\pi r \eta \quad (3)$$

La movilidad es directamente proporcional a la fuerza eléctrica del ion e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento. Este último se determina en un ion a partir de su tamaño y de la viscosidad del medio en el que migra. Las separaciones, por tanto, se basan en las diferencias en la relación carga/tamaño, el de mayor carga eléctrica migrará más rápidamente. En iones con la misma carga, migrará más rápido aquel de menor tamaño ya que tendrá una menor fuerza de retardo por rozamiento. La resistencia del medio al paso del ion también influirá en su movilidad electroforética, siendo ésta menor cuanto mayor sea la viscosidad del medio. No obstante, la μ_{ep} real, no coincide con lo predicho en la ecuación (3), debido a la existencia del flujo electroosmótico [Cázares, 2009].

c) MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA APARENTE

Para determinar la movilidad aparente (μ_{ap}) que se representa en la figura 15, de un analito se toma en cuenta la μ_{ep} del ion y la μ_{eo} de la solución según la ecuación (4):

$$\mu_{ap} = \mu_{ep} \pm \mu_{eo} \quad (4)$$

Debido a que las especies catiónicas se mueven en la misma dirección que el FEO, la μ_{ap} será la suma de la μ_{ep} y la μ_{eo} de tal manera que serán éstas las que alcancen primero la zona del detector. Para aniones la dirección de la μ_{ep} es contraria a la μ_{eo} de forma que la μ_{ap} será la resta de las dos movilidades.

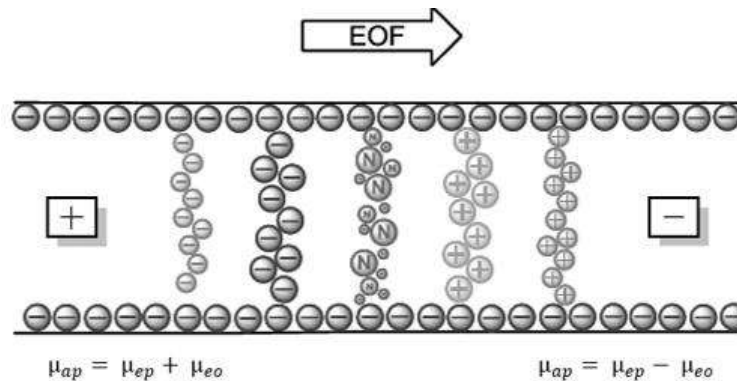


Figura 15. Movilidad electroforética aparente.

Fuente: Modificado de Casado, 2014

La movilidad aparente (μ_{ap}) puede calcularse a partir de datos experimentales, según la ecuación (5):

$$\mu_{ap} = \frac{L_d/t}{V/L_t} \quad (5)$$

Donde L_d es la longitud de la columna desde la inyección al detector, L_t es la longitud total de la columna de un extremo a otro, V es el voltaje aplicado entre los dos extremos y t es el tiempo

necesario para que un soluto migre desde el extremo de inyección hasta el detector, a lo que se conoce *tiempo de migración* (t_m).

La movilidad electroforética aparente es dependiente del voltaje y la longitud del capilar, así como de la composición del buffer, su concentración y pH, además de la temperatura debido a que ésta aumenta la energía cinética de los analitos [Cázares, 2009].

2.2.7 BUFFERS

Existe una amplia variedad de buffers que pueden ser empleados para EC. Un buffer es más efectivo dentro de 2 unidades de pH de su pKa, por ejemplo, el fosfato es utilizado ya que mantiene pH's de 2.5 y 7.0 aproximadamente y el borato un pH 9. La concentración típica del buffer es 10 – 100 mM. El buffer elegido debe poseer una buena capacidad tamponante al pH de trabajo, además éste debe tener baja absorbancia a la longitud de onda a la detección y baja movilidad electroforética para minimizar el paso de corriente.

Los buffers Zwitteriónicos se utilizan para las separaciones de proteínas y péptidos. La ventaja de estos buffers es su conductividad, reduciendo la corriente y el efecto joule. En ciertas preparaciones de buffers se les agregan sales de cloruros, fosfatos y sulfatos al medio, particularmente en aquellas dirigidas a la separación de proteínas. Estas sales afectan la conformación de la proteína y por consecuencia afecta la separación, así como su concentración afecta la FEO debido, a la doble capa iónica de las paredes del capilar.

Existe un fenómeno de adsorción que ocasiona una acumulación de moléculas de la muestra en la pared interna del capilar, que provocan señales indeseables y poco reproducibles, para esto es importante el empleo de aditivos que eviten dicha adsorción, así como la eliminación del FEO. Varios aditivos pueden ser agregados a los buffers para modificar las movilidades electroforéticas y para cambiar la selectividad de la separación [Cázares, 2007 Y Avila, 2013].

2.2.8 CARACTERIZACIÓN DE UN MICROORGANISMO POR ELECTROFORESIS CAPILAR

El primer experimento que demostró la posibilidad de mover microorganismos a través de capilares bajo un campo eléctrico aplicado, consistió en el análisis de *Lactobacillus casei* y virus del mosaico del tabaco (VMT). En ambos microorganismos se emplearon capilares de sílice fundida recubiertos de metilcelulosa para evitar la adsorción de los MO en las paredes internas del capilar. La detección se realizó en el intervalo del UV-VIS, el VMT fue detectado a 260 nm, mientras que *L. casei* a 220nm. Los electroferogramas resultantes mostraron picos agudos con un tiempo de migración menor a 4 minutos; sin embargo, no se logró su separación en mezcla. La primer separación de bacterias en mezcla consiguió la separación total o parcial de *Streptococcus faecalis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*; el proceso tomo 70 minutos. Tiempo después se reportaron separaciones análogas de tres

diferentes bacterias, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.* y *Alcaligenes eutrohus*. La inyección individual de cada bacteria permitió la identificación de los picos y su correspondiente movilidad y por tanto, su caracterización. En un estudio realizado recientemente se logró determinar de manera exitosa la factibilidad de analizar células fúngicas en su forma micelial mediante EC. Los hongos empleados en el estudio fueron *Botryosphaera rhodina* y *Trichoderma sp.* logrando obtener un tiempo de migración característico para cada hongo, así como un pico definido y simétrico bajo las condiciones electroforéticas ensayadas. Este estudio demostró que a pesar del tamaño de las células miceliales y su gran ramificación, se pueden realizar y caracterizar por EC.

Por otra parte, la EC ha mostrado capacidad para la evaluación de la interacción microorganismo –molécula. Las constantes de asociación son útiles para cuantificación de toda asociación molecular en estudios realizados de actividad farmacéutica, toxicidad y estudios microbiológicos. La medición de la movilidad electroforética está permitiendo el estudio de propiedades superficiales de las células microbianas, por medio de ésta ha podido detectarse la sutil pero importante heterogeneidad que puede existir en una población monoclonal. La posibilidad de separar de los conidios de hongos filamentosos mediante EC se consiguió mediante protocolos optimizados para su separación mediante el desarrollo de experimentos preliminares de los puntos isoeléctricos de los conidios de diferentes cepas. Aunque existen equipos sofisticados para el análisis y caracterización de los microorganismos no sustituyen a los métodos tradicionales que implican cultivos y microscopía [Avila, 2011].

2.2.9 OTRAS APLICACIONES DE LA EC

La electroforesis capilar es una herramienta analítica estándar, imprescindible en la bioquímica moderna y biología molecular; los procedimientos electroforéticos son usados en casi todos los aspectos de la investigación biomédica y clínica básica o aplicada. Usada en biotecnología para la caracterización y análisis de macromoléculas como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. En la industria farmacéutica para el estudio de nuevos y diversos fármacos, proteínas con actividad farmacológica, control de calidad y estructuras quirales. En el área de los alimentos se aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos. Además su uso en la toxicología forense ha resultado en la identificación de drogas y venenos que han causado daño o muerte en víctimas [Cázares, 2007].

III. JUSTIFICACIÓN

Algunos hongos filamentosos son responsables de ocasionar enfermedades en las plantas (hongos fitopatógenos), estos microorganismos constituyen un grupo de mucha importancia en la agricultura debido a su gran número y enorme capacidad de reproducción, por lo que regularmente se dificulta su control. Estos hongos generan grandes pérdidas en la agricultura y por consecuencia grandes pérdidas económicas, así como también los costos de producción aumentan al tratar de controlarlos [Arauz, 1998]. A nivel mundial los hongos fitopatógenos constituyen el grupo más importante desde el punto de vista económico, en cuanto a su frecuencia de aparición y al daño que puede llegar a causar; de las más de 100 mil especies de hongos descritas hasta ahora, más de 8 mil especies producen enfermedades en las plantas, es decir, son hongos fitopatógenos [Agrios, 2005].

Por todo lo anterior, es necesaria una herramienta de identificación, eficaz y oportuna para dar un diagnóstico preciso y poder iniciar la ofensiva contra el agente causal de la enfermedad; la técnica de Electroforesis Capilar es una herramienta analítica que proporciona datos precisos de moléculas orgánicas e inorgánicas, utiliza poca cantidad de reactivo y muestra, permite la separación, identificación y cuantificación de los analitos. Es una técnica muy prometedora para el estudio de propiedades electroforéticas de células intactas, para este caso las conidias. En trabajos anteriores, se observó que el sobrenadante de la suspensión de las conidias de *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y de algunas cepas silvestres del mismo género, produce una señal electroforética eficiente con pequeñas variaciones en su tiempo de migración, dependiendo de la especie. En este trabajo se desea conocer si la señal observada para *Trichoderma*, cuya composición se desconoce, está presente en otros géneros fúngicos y de ser así, si es posible que tales señales sean específicas, lo que conduzca a tener otra herramienta que contribuya a la identificación rápida de géneros fúngicos.



IV. HIPÓTESIS

El sobrenadante de las suspensiones de conidias de diferentes géneros fúngicos, tiene un componente que produce una señal característica de género y/o especie fúngica que permite su identificación.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las señales electroforéticas características de género y/o especie de diferentes especies fúngicas.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el efecto del medio de cultivo sobre la velocidad de crecimiento y las morfologías macroscópica y microscópica de los hongos de estudio.
- Obtener las señales electroforéticas de un compuesto liberado por las conidias de las cepas de estudio, obtenidas bajo diferentes condiciones de cultivo.
- Determinar si existen señales que sean características de género y/o especie que puedan ser usadas con fines de identificación.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1 INSTRUMENTACIÓN

- P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System Beckman Coulter®
- Balanza Analítica CP124 S Sartorius®, capacidad máxima de 120 g.
- Centrifuga Fisher Scientific Marathon 16 KM
- Potenciometro Fisher Scientific AB15 pH Meter accument® BASIC
- Sonicador 1510 BRANSON
- Vortex DAIGGER Vortex Genie 2
- Microscopio LEICA DM750 LEICA ICC50 HD

6.1.2 REACTIVOS

Todos los reactivos empleados para la preparación de las soluciones buffer son de grado analítico (Tabla 8). Para el lavado del capilar y ajuste de pH se utilizó NaOH 1M, HCl 1M y metanol. Para el medio mínimo Vogel se preparó con 15 g de agar, 15 g de dextrosa y 20 mL de Stock 50X de Vogel compuesto por vitaminas y minerales traza, en 1 L de agua.

Tabla 8. Reactivos utilizados

REACTIVO	NOMBRE	MARCA	GRADO
KH_2PO_4	Fosfato de potasio. Monobásico. Cristales finos	MEYER®	ACS
NaOH	Hidróxido de Sodio. Perlas	J.T. Baker®	ACS
HCl	Ácido Clorhídrico	J.T. Baker®	ACS
$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	Dextrosa	DIBICO®	
Líquido refrigerante	Fluorinert F77	3M	
Agar bacteriológico			
Agar Papa PDA	Potato Dextrose Agar	BD DIFCO®	
Vogel			
Agar Sabouraud	Agar Dextrosa Sabouraud	BD Bioxon®	
Agar Malta MDA	Malt Extract Agar	BD DIFCO®	
Agua Destilada			

6.1.3 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados se muestran en la Tabla 8 y se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos se esterilizaron en autoclave a 120°C y 15lb/in² de presión durante 15 minutos.

6.1.4 CEPAS UTILIZADAS

Se utilizaron trece cepas silvestres que fueron proporcionadas por el Cepario del Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del centro multidisciplinario de Estudios de Biotecnología (CMEB), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UMSNH (Tabla 9).

Género	Especie	Clave
<i>Penicillium</i>	<i>pencasmium</i>	05-ICH 181
<i>Penicillium sp.</i>		23-AT 1918
<i>Penicillium sp.</i>		SG-18 A18
<i>Penicillium sp.</i>		SG-30 181
<i>Penicillium</i>	<i>lilacionoechinulatum</i>	SG-39 1918
<i>Pochonia sp.</i>		97
<i>Pochonia sp.</i>		215
<i>Umbelopsis</i>	<i>vinacca</i>	110
<i>Umbelopsis sp.</i>		75
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	208
<i>Pestalotiopsis sp.</i>		212
Desconocida 1		172
Desconocida 2		205

6.1.5 CULTIVO

Se realizaron subcultivos por duplicado de las 13 cepas a estudiadas en los 4 diferentes medios: PDA, MDA, Vogel y Sabouraud. Se tomó un bocado de 5 mm de ancho de cada una de las cepas y se colocó en el centro de las cajas Petri de forma individual, se incubaron a 28 °C y se realizaron mediciones radiales en cm cada 24 h hasta que el hongo dejara de crecer o alcanzara el borde de la caja de Petri. También se registraron los periodos de conidiación. Estos datos sirvieron para determinar las cinéticas de crecimiento de las cepas estudiadas. Se registraron las características macro y microscópicas (Leica DM 750 acoplado a cámara Leica ICC50 HD) de todas las cepas después de su crecimiento.

6.1.6 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Para calcular la velocidad de crecimiento de las cepas, se graficó el tiempo (días) contra el Logaritmo base 10 del radio de crecimiento (radio en cm). La pendiente de dichos gráficos representa la velocidad de crecimiento en Días⁻¹ para cada uno de los medios.

6.1.7 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las conidias presentes en los cultivos, se cosecharon virtiendo sobre la caja de Petri 1.5 mL de agua estéril, agitándola manualmente y raspando ligeramente para que las conidias se desprendieran. La suspensión formada, se recolectó con pipeta Pasteur y se vació en un microtubo de 1.5 mL; posteriormente se agitaron en Vortex durante 5 minutos para que las conidias se desprendieran del micelio, se dejaron reposar los tubos durante 10 minutos de manera vertical para que se sedimentaran los restos del micelio y poder eliminarlos recuperando únicamente el sobrenadante, que es donde se encuentran las conidias suspendidas. El sobrenadante con las conidias se mantuvo en reposo por 24 y 48 h. Pasado el tiempo, se centrifuga el microtubo a 13,300 g durante 10 min y se toma una alícuota 400 µL del sobrenadante, se colocó en un vial para electroforesis y se mezcló con 200 µL del buffer de corrimiento para su posterior análisis. Antes de realizar el análisis electroforético, el vial se sónica (Branson 1510) por 10 min para eliminar micro-burbujas que podrían alterar los resultados de EC.

6.1.7 BUFFER UTILIZADO

Se utilizó una solución fosfato de potasio (MEYER ®) 10 mM pH's 6.3 y 6.8 como buffer de corrimiento. Se utilizó una solución fosfato de potasio (MEYER ®) 10 mM como buffer de corrimiento a pH 6.8 y pH 6.3 los utilizados por Avila en el 2013.

6.1.8 CONDICIONES ELECTROFORÉTICAS

Los corrimientos electroforéticos se realizaron en un equipo de EC P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter®) con las siguientes condiciones:

- Capilar: de sílice fundida recubierto de poliamida con un di de 100 µm y L_T de 50 cm.
- T: 25 ° C.
- Detector: de Arreglo de diodos
- Longitud de onda: 201 nm
- Voltaje: Polaridad inversa (-17 kV).
- Presión: 20.0 psi.
- Buffer: Buffer de fosfatos (KH₂PO₄) 10 mM pH 6.3 y pH 6.8

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

7.1.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Se creció a las diferentes cepas en 4 medios de cultivo distintos para observar si los medios de cultivo influían diferencialmente en el crecimiento, el carácter de las colonias y la esporulación de los hongos de ensayo, a causa de los constituyentes de los diferentes medios, siendo así, modificaran estructuralmente la conformación de los componentes del hongo y por ende la estructura de las conidias lo que modificara directamente el electroferograma resultante.

a) *Penicillium*

Penicillium pencasmium 05-ICH 181

La morfología macroscópica de la cepa 05-ICH 181 fue diferente en los 4 medios (Fig. 16), siendo la única similitud la coloración característica verde aunque no muy visible en el medio Sabouraud, aún más parecida en los medios MMV y MDA que es una coloración verde mate de aspecto pulverulento, síntoma de conidias presentes, pero en cuanto a forma de crecimiento totalmente diferentes; creciendo en MMV de manera circular, presentando una especie de zanjas en forma de ondas circulares del centro hacia afuera y al reverso una coloración beige; en cambio en el medio MDA crece de forma irregular, creciendo una tela similar a la telaraña que probablemente sea micelio aéreo y al reverso una coloración beige; en el medio PDA esta cepa de *Penicillium* crece de manera circular uniforme, primeramente lanzando una tela fina sobre el agar la cual después creció en ella micelio aéreo que viró a verde, se aprecian anillos en ella y al reverso una coloración caqui; ya por ultimo en el medio Sabouraud creció totalmente diferente a los demás medios, blanco, aterciopelada, presentando estrías a manera de zanjas radiales un halo con coloración verde-grisácea de aproximadamente 1.2 cm en donde se encontraban las conidias, creciendo circularmente, al reverso se aprecia que viró el medio a amarillo-naranja, mostrando el más bajo crecimiento respecto a los demás y menor esporulación. Creciendo 1.2 cm radiales en 8 días en promedio que de acuerdo a las especies de *Penicillium* descritas por Arias y Piñeros (2008), ésta cepa *P. pencasmium* tiene una morfología, aspecto y crecimiento del género *Penicillium* y que la mayorías de las especies descritas crecen a semejante ritmo que la cepa 05-ICH.

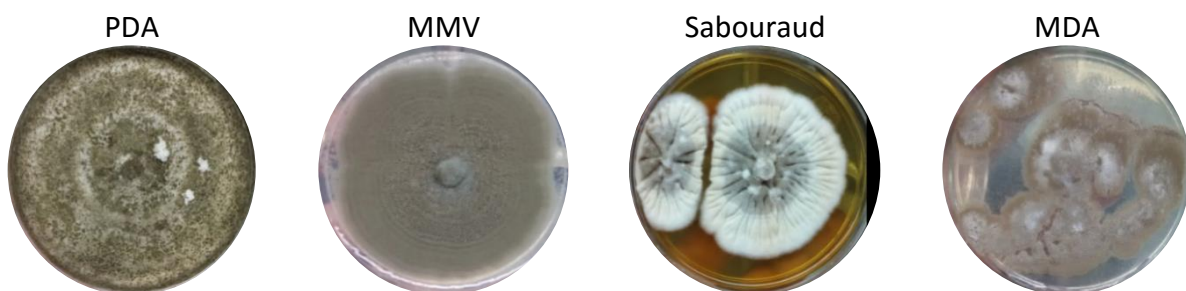


Figura 16: Crecimiento de *Penicillium pencasmium* 05-ICH 181 en los 4 diferentes medios

Penicillium sp. 23-AT 1812

La cepa 23-AT 1812 de *Penicillium sp.* creció circularmente de manera similar en los 4 medios (Fig. 17), llenando la caja de Petri en tan solo 3.3 días formando una especie de halo transparente que conforme pasaba el tiempo en los medios PDA y MMV crecía el micelio aéreo más rápido de adentro hacia afuera y viraban a verde-mate hasta tomar un aspecto polvoso por las conidias, formando halos concéntricos, al reverso ligeramente beige pero en el MMV al centro con una coloración verde intensa; Y para los medios Sabouraud y MDA las mismas características descritas en los medios PDA y MMV a diferencia que en estos no viró a verde-mate directamente sino que viraron primero a un especie de coloración verde limón que con el tiempo viraban uniformemente a verde-mate. Las características de crecimiento mostradas por esta cepa son similares a las descritas en la bibliografía para el género Arias y Piñeros, 2008.

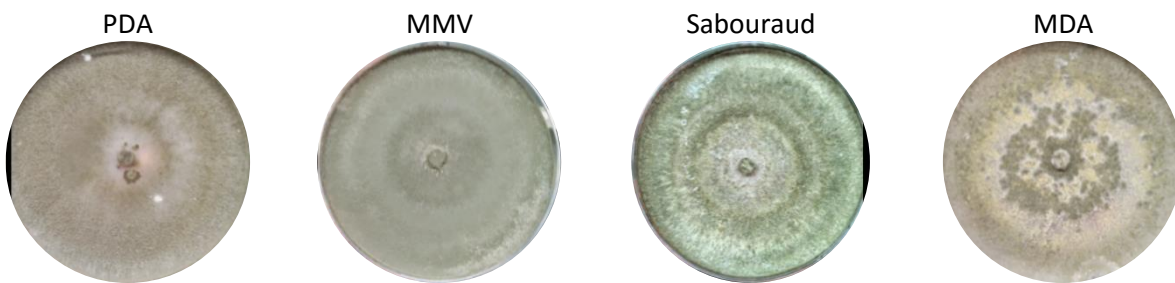


Figura 17. Crecimiento de *Penicillium sp.* 23-AT 1812 en los 4 diferentes medios

Penicillium sp. SG-18 A18

La cepa SG-18 A18 de *Penicillium sp.* creció de manera similar en cuanto a estructura, forma de la colonia (Fig. 18) y crecimiento radial lento, creciendo solo 0.9 cm radiales en promedio, siendo en el MMV el mas lento. En los medios PDA, MMV y MDA el hongo crece formando una especie de halo transparente en la circunferencia que conforme crece vira a amarillo Pasado el tiempo aparecen una especie de acérvulos como los de *Pestalotiopsis* o granitos verdes que son las conidias de mayor intensidad en el PDA que en los otros 2 medios, presentando líneas surcadas en forma de ondas y al reverso coloracion entre beige y naranja. En medio Sabouraud las características de crecimientos son semejantes peropresentando mayor formación de conidias. Solo pocas características de *Penicillium* presenta esta cepa.

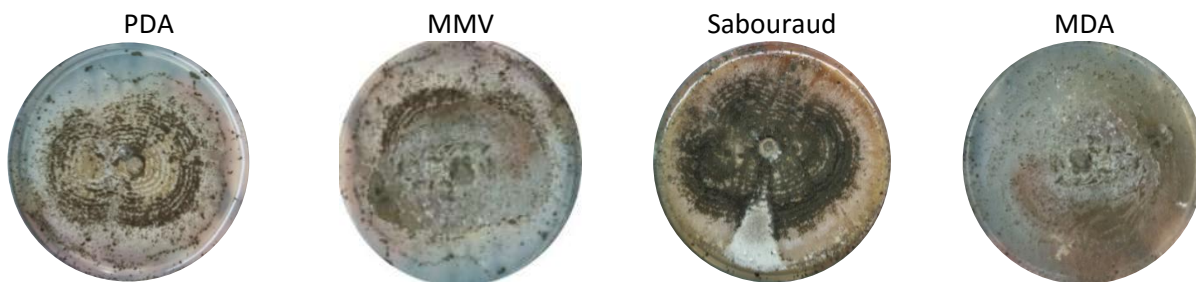


Figura 18. Crecimiento de *Penicillium sp.* SG-18 A18 en los 4 diferentes medios

Penicillium sp. SG-30 181

Esta cepa alcanzó un crecimiento promedio en los 4 medios (Fig. 19): entre 1.1 cm radiales en 7 días; en los medios PDA, MMV, y MDA el borde que era blanco se tornaba a verde conforme crecía. Pasado el tiempo la superficie de la colonia se tornó de color verde olivo, con aspecto polvoso por las esporas y ligeramente surcada radialmente, más evidente en los medios PDA y MMV, al reverso una coloración beige débil para MMV y MDA y fuerte para PDA, más al centro que en las orillas; para el medio Sabouraud que fue en el que creció muy diferente, virando el medio a amarillo, creciendo aterciopeladamente de color blanco que viró a verde-mate lo cual dicha coloración no viro totalmente la colonia, presentó exudado como gotitas amarillas, líneas surcadas y al reverso beige-amarillo. Fue la cepa de *Penicillium* que entre medios creció más uniformemente. Esta cepa tiene fuertes características que la describen como *Penicillium*, como lo es la coloración verde-olivo (Arias y Piñeros, 2008).

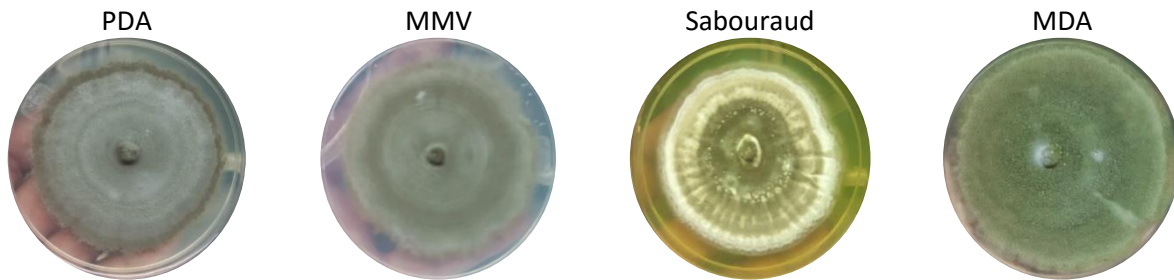


Figura 19. Crecimiento de *Penicillium sp.* SG-30 181 en los 4 diferentes

Penicillium lilacionoechinulatum SG-39 1918

Esta cepa tiene mucha similitud en cuanto a las características de crecimiento con la SG-30 181 en todos los medios (Fig. 20); los medios PDA, MMV y PDA, presentando crecimiento aproximado de 1 cm en 7 días siendo el MMV el más lento, crecimiento semiradial, aterciopelado blanco que conforme crecía viraba a verde, no llenando la placa, y deteniendo su crecimiento a los 3 cm radiales. En los MDA y MMV creció micelio aéreo aplanado parecido a una telaraña, en PDA y MDA, exudado como gotitas de agua sobre sí, y al reverso una coloración beige más en el PDA; en Sabouraud exhibe crecimiento circular, creciendo hasta 1.2 cm radiales en 7 días, aterciopelado blanco, con relieves, que con el tiempo viro a verde solo en el centro, viró el medio ligeramente a amarillo, exudado como gotitas amarillas sobre sí y al reverso beige en donde se observan mejor los relieves.

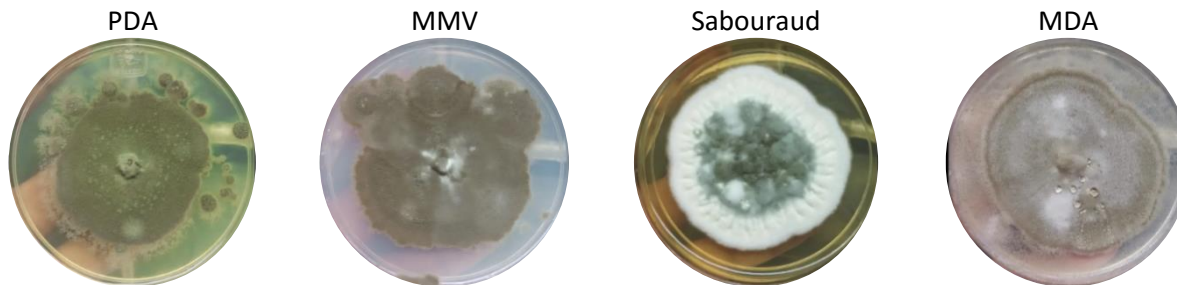


Figura 20. Crecimiento de *P. lilacionoechinulatum* SG-39 1918 en los 4 diferentes medios

b) *Pochonia*

Pochonia sp. (97)

El crecimiento de *Pochonia* sp. 97 fue diferente en los 4 medios de cultivo probados (Fig. 21). En el medio PDA tuvo un crecimiento circular conforme crecía de aspecto aterciopelado blanco que viraba a verde olivo lo que indica la presencia de conidias; con el tiempo la colonia se volvió lisa, de crecimiento lento solo 0.9 cm radiales en 7 días y después de 16 días ya no creció pero crecieron colonias a su alrededor a causa de las primeras conidias, probablemente debido al movimiento ocasionado al ser observadas, exudado abundante como gotitas que desaparecieron y al reverso una coloración beige; en el medio MMV creció circularmente, aterciopelado blanco que con el tiempo viró a verde y aspecto liso, y creciendo sobre ésta capa lisa micelio aéreo aplanado de color blanco, al reverso beige, de crecimiento lento solo 0.6 cm radiales en 7 días; en el medio Sabouraud creció de forma irregular, aterciopelado blanco, presentando estrías a manera de zanjas del centro hacia afuera, presentó un halo con coloración verde-grisácea de aproximadamente 1 cm en donde se encontraban las conidias, viró el medio a una coloración amarillenta, exudado abundante como gotitas, creciendo lento solo 0.8 cm radiales en 7 días y que después del día 21 ya no creció, reverso amarillo por debido a que viró el medio; en el medio MDA se mostró de aterciopelado blanco que conforme crecía éste se volvía verde que pasado el tiempo se volvió de aspecto polvoso, con manchones blancos que es el micelio aéreo de aspecto telarañoso, crecimiento lento solo 0.7 cm radiales en 7 días, mostrando extensiones diferentes que pudieron ser a causa de que se expusieron a la luz cada vez que se examinaban las cajas de cultivo para realizar mediciones y/u observaciones, al reverso de color beige más al centro que en la circunferencia. Las características de crecimiento aquí descritas se asemejan a las descritas para *P. clamydospora* (Arévalo *et al.*, 2009; Franco *et al.*, 2012; Montes de oca, 2004).

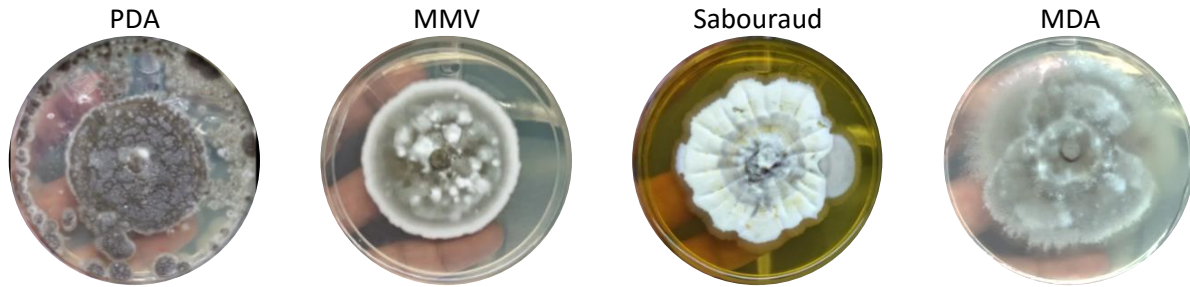


Figura 21. Crecimiento de *Pochonia sp. 97* en los 4 diferentes medios

Pochonia sp. (215)

El crecimiento de esta especie de *Pochonia* (215) se presenta de manera distinta en cada uno de los 4 medios utilizados (Fig. 22). Lo único similar entre ellas es el crecimiento lento alcanzando 1 cm radial en 7 días; crecimiento irregular, no llenaron la caja de Petri y la coloración es verde, aunque no muy visible en algunos; en PDA se muestra aterciopelado blanco ligeramente que conforme crecía viraba a verde y que después apareció micelio aéreo de aspecto telarañoso, viró el medio a naranja; en el medio MMV las colonias se mostraron de forma aterciopelada blanca que conforme crecía viraba a verde, abultado más al centro debido a la carga de conidias, líneas surcadas a manera de ondas, presentó regiones de color más claro (verde-mate), que la coloración de base (verde fuerte), al reverso beige; en el medio Sabouraud al igual que en el PDA viró el medio a naranja, aterciopelado blanco ligero que viró a verde-grisáceo más en las orillas que al centro, exudado como gotitas amarillas, relieves irregulares y al reverso naranja, es importante señalar que esta cepa y para este medio se presentaron las conidias solo en la circunferencia a diferencia que en el caso de la cepa 97 que se presentaron en el centro; en el medio MDA produce un aspecto polvoso de coloración verde mate, viro al medio a naranja en la región que estaban las colonias más grandes y al reverso naranja. Las características de crecimiento aquí descritas, al igual que las descritas para la cepa 97, se asemejan a las descritas para *P. clamydospora* (Arévalo et al, 2009; Franco et al, 2012 y Montes de oca, 2004).

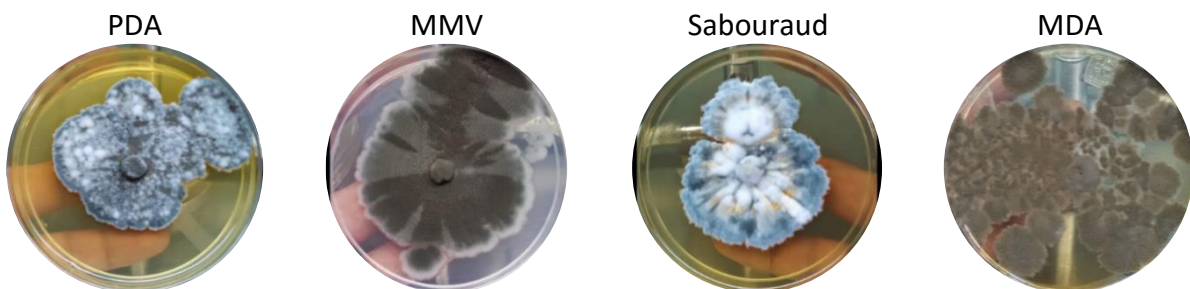


Figura 22. Crecimiento de *Pochonia sp. 215* en los 4 diferentes medios

c) *Umbelopsis*

Umbelopsis vinacca (110)

U. vinacca en medio PDA creció relativamente lento alcanzando 2 cm radiales en 8 días de aspecto algodonoso blanco que con el tiempo se tornó a una coloración ligeramente café o marrón, crecimiento circular uniforme, al reverso ligeramente beige, en agar mínimo Vogel son de lento crecimiento alcanzando un diámetro de 1 cm radiales en 7 días, de aspecto aterciopelado, de color marrón más al centro que en las orillas, conforme crecía se tornaba marrón en la superficie lo que nos indica la presencia de conidias, presentando anillos y al reverso una coloración beige-amarillo, lo que la hace similar a la especie *U. isabellina* descritas por Ya-ning *et al* (2013) y Kubátová (2014), como características del género. En medio Sabouraud creció similar al que se presentó en el medio PDA, a diferencia de que es de aspecto seco y al reverso tiene una coloración beige más intensa; sin embargo, un aspecto importante es que en este medio la cepa *U. vinacca* no conidió; en MDA creció de forma irregular, aterciopelado blanco, más al centro que en la circunferencia, la cual después de tiempo se presentó conidiación en esta última, crecimiento lento, alcanzando el centímetro radial en 7 días y al reverso con coloración beige (Fig. 23)

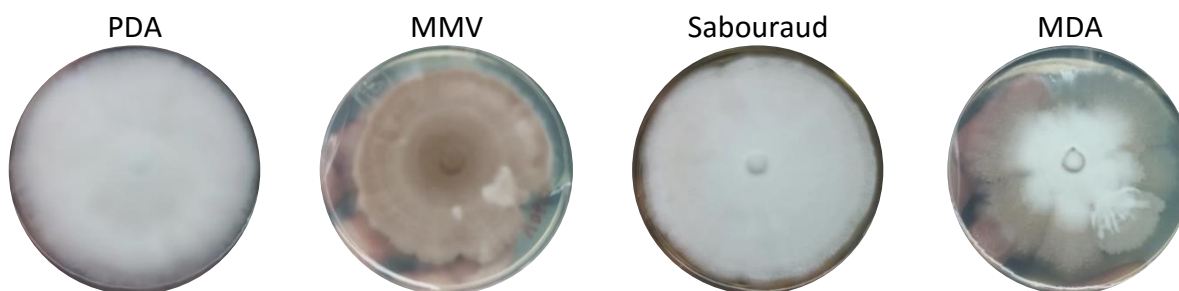


Figura 23. Crecimiento de *Umbelopsis sp.* 110 en los 4 diferentes medios

Umbelopsis sp. (75)

Observando de manera detallada los cultivos, se puede apreciar que tienen prácticamente el mismo comportamiento que el presentado por la cepa 110 (Fig. 24). En medio PDA la cepa creció relativamente lento alcanzando 2.2 cm radiales en 8 días. De aspecto algodonoso blanco que con el tiempo se tornó a una coloración ligeramente café o marrón, crecimiento circular uniforme, al reverso ligeramente beige; en agar mínimo Vogel son de lento crecimiento alcanzando un diámetro de 1 cm radial en 7 días, de aspecto aterciopelado, de color marrón más al centro, conforme crecía se tornaba marrón en la superficie lo que nos indica la presencia de conidias, presentando anillos y al reverso una coloración beige, lo que la hace similar a la especie *U. isabellina* (Ya-ning *et al.*, 2013; Kubátová, 2014); El crecimiento en medio Sabouraud fue similar al que se presentó en el medio PDA, a diferencia de que es de aspecto seco y al reverso tiene una coloración beige más intensa; sin embargo, un aspecto importante es que en este

medio la cepa 75 no conidió; en MDA creció de forma irregular, aterciopelado blanco, más al centro que en la circunferencia, la cual después de tiempo ésta conidió, crecimiento lento, alcanzando el centímetro en 7 días y al reverso con coloración beige.

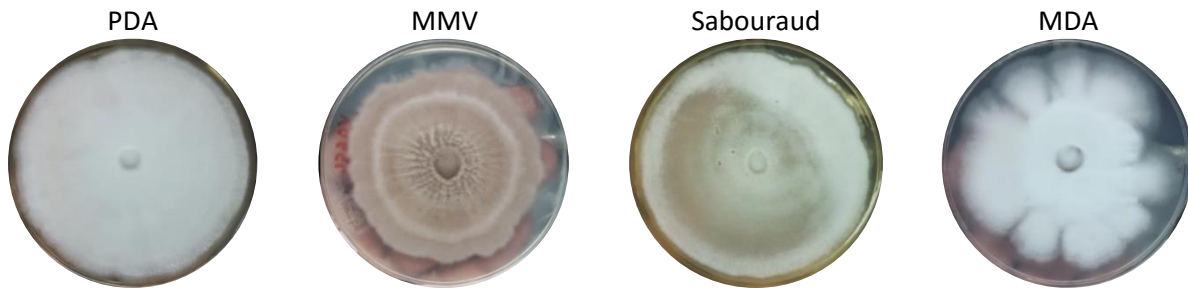


Figura 24. Crecimiento de *Umbelopsis* sp. 75 en los 4 diferentes medios

d) *Fusarium oxysporum* (208)

F. oxysporum creció en los 4 medios dando una colonia blanca la cual produjo un pigmento de rosa a violeta que aumentó de manera gradual, creciendo 3.4 cm de manera radial en 8 días en promedio, la morfología en los 4 medios de esta cepa no fue igual (Fig. 25); sin embargo, todas presentaron la misma coloración violeta o rosa; en PDA creció aterciopelado blanco con pigmento rosa, micelio aéreo, presentando anillos y al reverso color vino como fue descrito por Guzmán (1977); en medio mínimo Vogel la colonia fue lisa, de coloración blanca ligeramente pigmentada de rosa y al reverso totalmente igual que al anverso; En Sabouraud se mostró una colonia rosa más pigmentada que en el medio Vogel, presentando micelio aéreo de manera algodonosa, un halo al centro con menor pigmentación, al reverso de coloración vino intenso, una característica importante de éste medio es que la cepa no conidió, esto pudo ser debido a que el hongo no se encontraba en un medio que carecía de nutrientes ya que según Agrios (2005), un hongo usa las esporas o conidias para seguir subsistiendo cuando éste se ve amenazado por la escases de los nutrientes, por lo que *Fusarium oxysporum* se encontraba cómodo; en MDA creció con una película lisa con ligeras estrías sobre el agar, conidiando de esta manera, presenta anillos, conforme pasaba el tiempo crecía micelio aéreo color blanco y al reverso misma coloración lo que indica que no viro el medio.

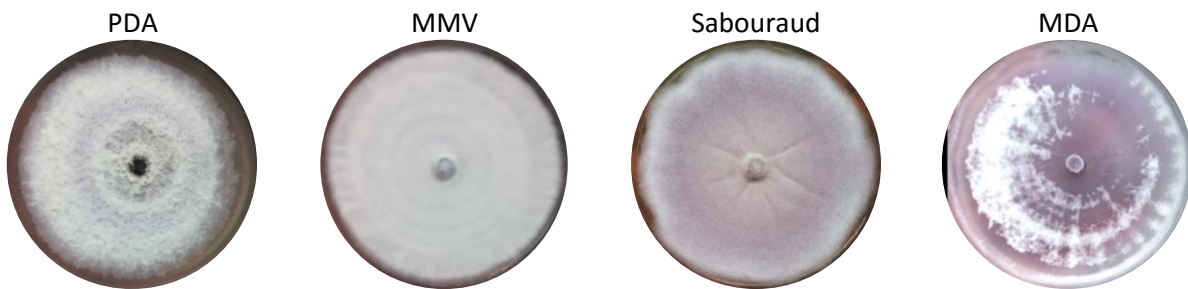


Figura 25. Crecimiento de *Fusarium oxysporum* 208 en los 4 diferentes medios

e) *Pestalotiopsis* sp. (212)

Esta cepa presenta similitud en los crecimientos para los medios PDA, MMV y MDA (Fig. 26): colonia blanca algodonosa, con micelio aéreo, crecimiento circular uniforme, presentando anillos concéntricos denominados acérvulos, que es donde están las conidias, alrededor de los 7 días de incubación, al reverso se aprecian mejor estos anillos y alcanzando un promedio de crecimiento de 3.4 cm radiales en 7 días. De acuerdo con las descripciones de Ulloa (1978) y Labarca *et al* (2007) las características se asemejan a una especie del género *Pestalotiopsis*; sin embargo, en medio Sabouraud, esta cepa crece de manera distinta a las demás, conservando la forma algodonosa y de micelio aéreo, creciendo de manera irregular con una coloración amarillenta y virando el medio a naranja creciendo rápidamente en tan solo 7 días alcanzando 3.8 cm de crecimiento radial, es importante señalar que la cepa en este medio no conidió debido a que el medio Sabouraud no está diseñado para la esporulación de hongos.

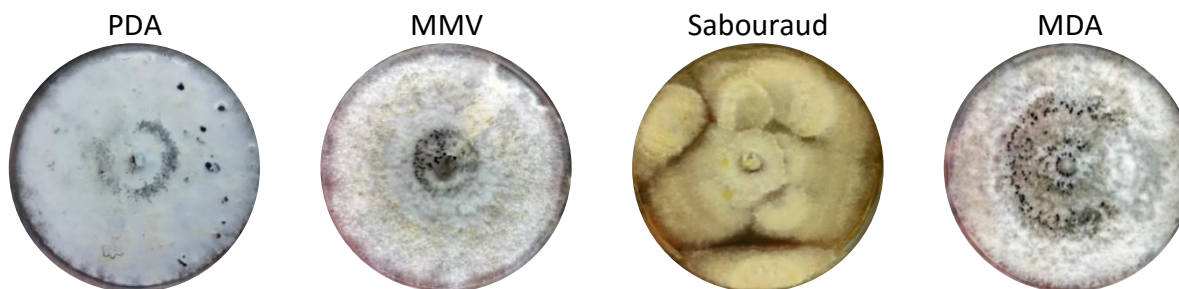


Figura 26. Crecimiento de *Pestalotiopsis* sp. 212 en los 4 diferentes medios

f) Cepa 172

Las colonias de la cepa (172) de manera general alcanzaron un crecimiento entre 1.1-1.3 cm radiales en 7 días, después del día 20 estas crecían más lentamente, ya para los medios PDA, MMV, y MDA (Fig. 27); conforme crecían, el borde que era blanco se tornaba a verde, ya pasado el tiempo la superficie de la colonia se tornó de color verde olivo, con aspecto polvoso por las esporas y ligeramente surcada (en el MMV) radialmente, al reverso una coloración beige débil para MMV y MDA y fuerte para PDA, más al centro que en las orillas; para el medio Sabouraud que fue en el que creció muy diferente, virando el medio ligeramente amarillo, creciendo aterciopeladamente de color blanco que viraba a verde-mate lo cual dicha coloración no viro totalmente la colonia, al reverso beige-amarillo. Lo que indica que tiene características importantes que posee un hongo del género *Penicillium* como al reverso coloración beige, la colonia vira a verde, características a las descritas en el medio Sabouraud de la cepa SG-30 de *Penicillium* por lo que se sugiere que este hongo de nombre clave 172 es un *Penicillium*.

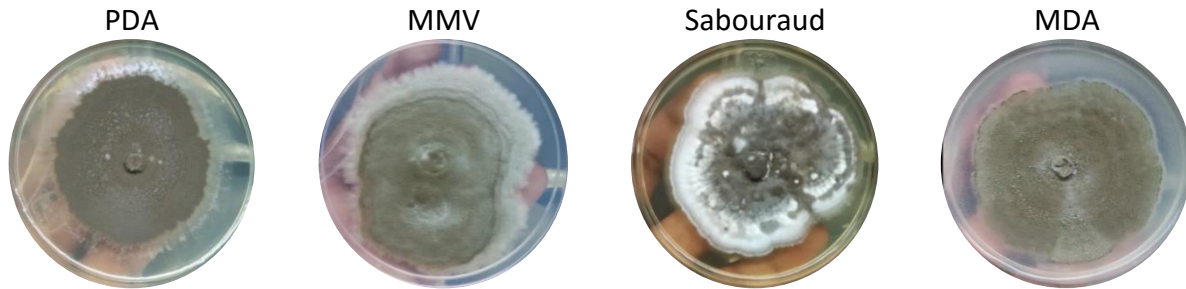


Figura 27. Crecimiento de la cepa 172 en los 4 diferentes medios

g) Cepa 205

Esta cepa ha mostrado similitudes morfológicas en los 4 diferentes medios (Fig. 28) a las que presentan las cepas del género *Penicillium* sugiriendo que la cepa 205 sea un probable *Penicillium*, creciendo en el medio PDA aterciopelado blanco que viró a verde, creciendo lento de forma irregular alcanzando hasta 1 cm en 8 días, no llenando la placa, aspecto polvoso. Podemos apreciar 2 tonos de coloración verde, también presentó líneas surcadas y al reverso una coloración beige; en el medio MMV mostrándose con coloración verde, creciendo lento tan solo 1 cm radial en 8 días , aterciopelado blanco que con el tiempo viró a verde, de coloración una verde-mate, presentando un abultamiento de conidias al centro, llenando la placa, líneas surcadas y al reverso una coloración beige en un halo y en el resto no presentaba ésta coloración; en el medio Sabouraud una característica importante que el *Penicillium* en el medio Sabouraud es que vira al medio de color amarillo descrita anteriormente virando el medio a amarillo, creciendo aterciopeladamente de color blanco que viró a verde lo cual dicha coloración no viro totalmente la colonia dejando a los bordes de la colonia blancos, líneas surcadas y al reverso beige-amarillo y para el medio MDA la cepa creció de la misma forma que el PDA y MMV, con coloración verde aterciopelado blanco que vira a verde, creciendo tan solo 1.2 cm radiales en 8 días, creciendo de forma irregular, presentando micelio aéreo aplanado con aspecto telarañoso sobre la coloración verde y al reverso una coloración beige-amarillo.

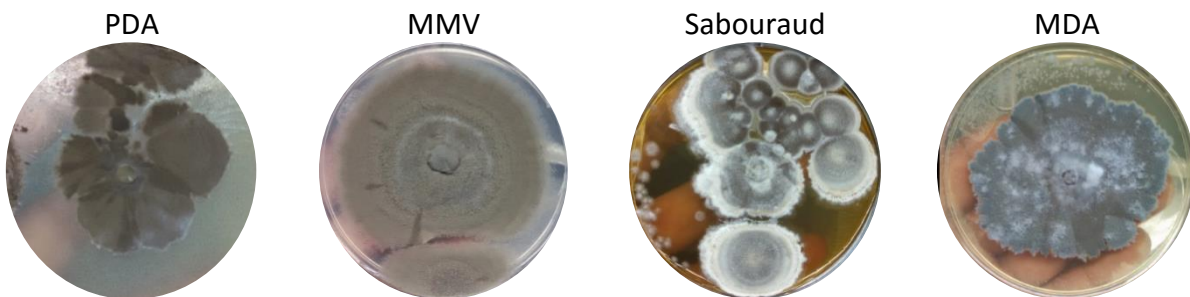


Figura 28. Crecimiento de la Cepa 205 en los 4 diferentes medios

7.1.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Se utilizaron 4 medios de cultivo distintos, para observar si había diferencias aparentes en la forma, el color, grosor de las conidias, que son las características que podrían influir en la composición del sobrenadante de la suspensión de conidias y por tanto, en las señales electroforéticas.

a) *Penicillium*

Penicillium pencasmium 05-ICH 181

En la especie *P. pencasmium* 05-ICH 181 las conidias se presentaron en los medios PDA y MDA esféricas lisas y globosas al observarlas al microscopio, se aprecia una agrupación entre ellas formando desde pares hasta grupos de 5 o más, esto puede ser a consecuencia de las cargas de las conidias y/o a que aún no se desprenden de sí mismas después de desprendidas de la fiálide. Apenas se aprecia una coloración verde hialina de las conidias, tal y como las describen Arias y Piñeros (2008). Esta cepa, *P. pencasmium*, tiene una morfología microscópica con aspectos importantes del género *Penicillium*; sin embargo, en los medios MMV y Sabouraud las conidias no son como en los medios PDA y MDA, siendo estas en forma como de cristales, hialinas, muestran un agrupamiento tal y como lo muestran en los medios PDA y MDA.

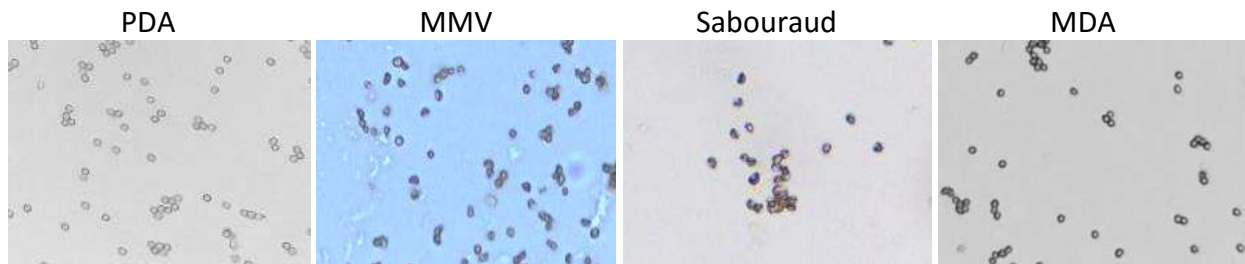


Figura 29: Micrografía de Conidias de *P. pencasmium* 05-ICH 181 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X

Penicillium sp. 23-AT 1812

En ésta especie de *Penicillium*, en los medios PDA y MDA se obtuvieron conidias de forma ovalada un poco alargada con aspecto en forma de un frijol, con coloración ligeramente verde, forman agrupaciones; en el medio MMV las conidias son producidas en cadena, esféricas, hialinas de pared delgada; en el medio Sabouraud las conidias se presentaron de forma de polígonos irregulares, con aspecto de cristales, presentan agrupaciones. Las conidias de éste género son distintas entre sí, dependiendo del medio de cultivo en el que crecen ya que cada uno tiene diferente composición de nutrientes. Gómez (1950) describe las posibles formas de las conidias de un *Penicillium* en donde hace mención que no necesariamente las conidias deben ser de la misma forma.

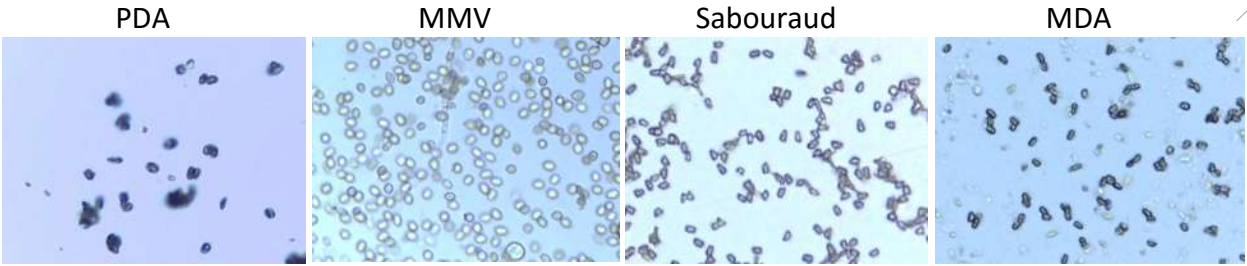


Figura 30: Micrografía de Conidias de *Penicillium sp. 23-AT 1812* de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X

Penicillium sp. SG-18 A18

En esta especie, la SG-18 A18, las conidias presentan la misma forma en los 4 medios, ovalada con aspecto de frijol, son conidias producidas en cadena, hialinas, de coloración verde, también presentan agrupaciones entre ellas a causa de las interacciones de sus cargas, más notorias en los medios PDA, Sabouraud y MDA.

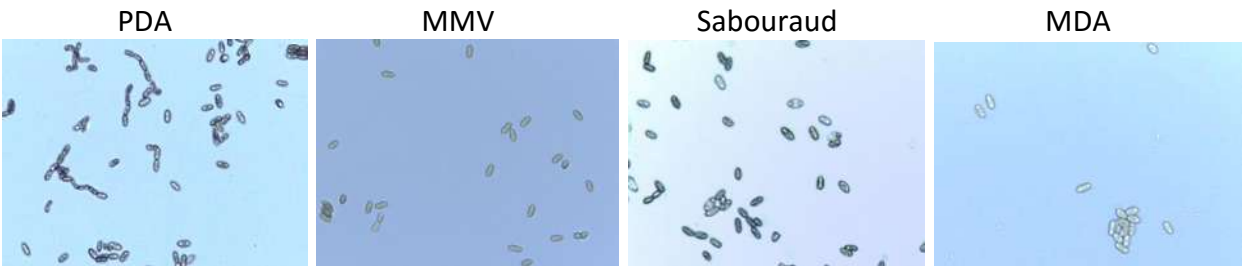


Figura 31: Micrografía de Conidias de *Penicillium sp. SG-18 A18* de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X

Penicillium sp. SG-30 181

Para la cepa *Penicillium SG-30 181* las conidias se presentaron en los 4 medios en forma globosa y esférica; son conidias producidas en cadenas, presentan agrupaciones entre sí, más evidente en los medios MDA y PDA, hialinas y con coloración verde notable en los medios MMV y Sabouraud, cumpliendo las características típicas del genero *Penicillium*.

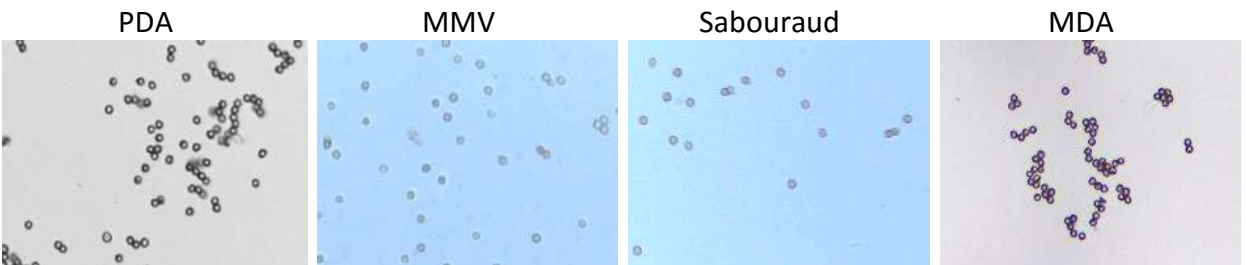


Figura 32: Micrografía de Conidias de *Penicillium sp. SG-30 181* de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X

Penicillium lilacionoechinulatum SG-39 1918

La cepa de *Penicillium* SG-39 1918 tiene gran similitud en cuanto a las características macroscópicas con la cepa SG-30 181 también de *Penicillium*, presentando gran parecido morfológico de las conidias. La morfología de las conidias obtenidas en los 4 medios fue forma globosa y esférica; son conidias producidas en cadenas, presentan agrupaciones entre sí, hialinas y con coloración verde notable en el medio MMV, cumpliendo las características típicas del género *Penicillium*.

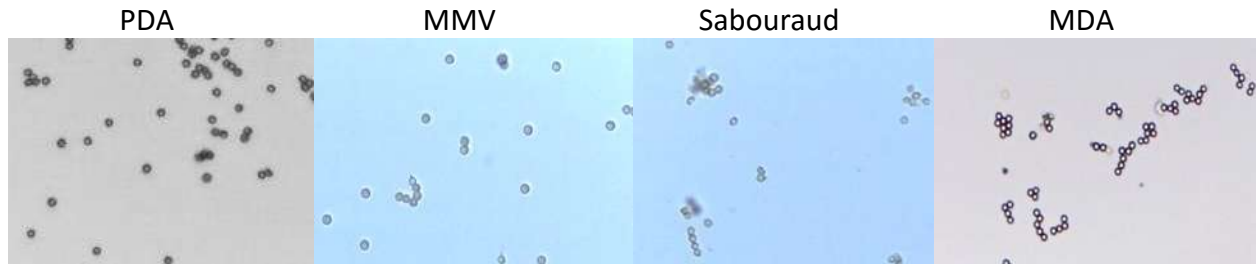


Figura 33: Micrografía de Conidias de *P. lilacionoechinulatum* SG-39 1918 de los diferentes medios observadas con el objetivo

b) *Pochonia*

Pochonia sp. (97)

Las conidias de *Pochonia* sp. 97 en los medios PDA, MDA y MMV (Fig. 34) fueron de forma esférica, de hialinas a verdes. También presentan agrupaciones, generalmente en pares, y en medio Sabouraud se mostraron como conidias de forma subglobosa, elipsoidal a bacilar, hialinas a una coloración crema tenue. Siendo las del medio Sabouraud y MMV como las descritas por Montes de Oca (2004) y por Tejada (2009).

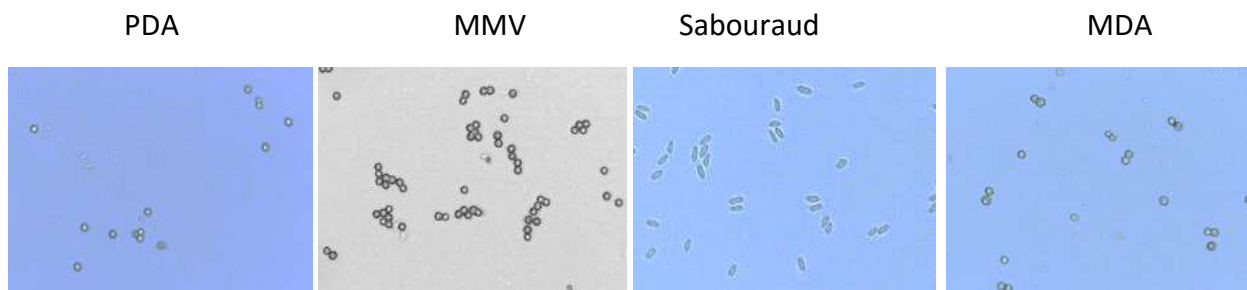


Figura 34. Micrografía de Conidias de *Pochonia* sp. 97 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X

Pochonia sp. (215)

Las conidias de la cepa 215, son de forma esférica-elipsoidal en medio mínimo Vogel, presentan agrupaciones que por lo general son entre pares, para los medios MDA y PDA las conidias tienen

una forma esférica globosa y ligeramente elipsoidal, presentan agrupaciones y cadenas, siendo probablemente éstas agrupaciones a causa de la atracción de las cargas de las conidias y en el medio Sabouraud las conidias se mostraron con una coloración verde brillante de forma esférica globosa y ligeramente elipsoidal, también se agrupan pero no como en los PDA, MMV y MDA. Solo en los medios PDA, Sabouraud y MDA se mostraron las conidias como las descritas por Montes de Oca (2004) y Tejada (2009).

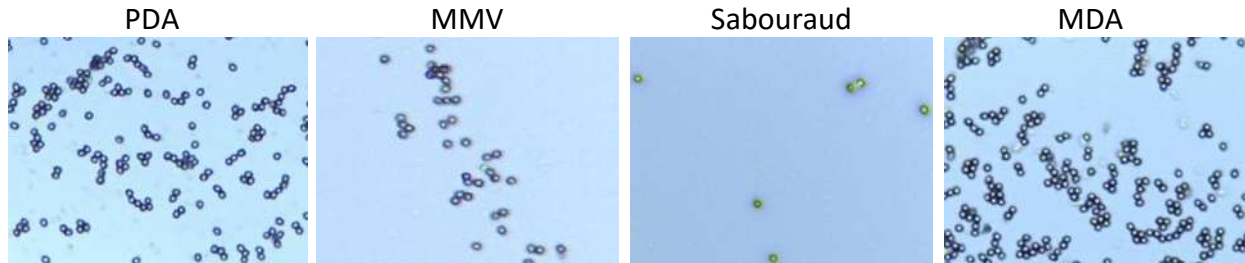


Figura 35: Micrografía de Conidias de *Pochonia sp. 215* de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X

c) *Umbelopsis*

Umbelopsis vinacca (110)

Las conidias de esta cepa son de aspecto parecido a las que describen Ya-ning, *et al* (2013) en los medios PDA, MMV y MDA; presentando conidias marrones de forma irregular dando un aspecto a cristales o figuras octagonales o hexagonales, presentando en PDA y MDA agrupaciones de las conidias; en el medio Sabouraud no se hicieron presentes las conidias, ya que según Cañedo (2004) el medio Sabouraud no es un medio diseñado para estudiar la esporulación de los hongos.



Figura 36: Micrografía de Conidias de *U. vinacca* 110 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X. (No conidio N.C.)

Umbelopsis sp. (75)

Las conidias de esta cepa son también de aspecto parecido a las que describen Ya-ning, *et al* (2013) en los medios PDA, MMV y MDA; presentando conidias marrones de forma irregular dando un aspecto a cristales o figuras octagonales o hexagonales, presentando agrupaciones de las conidias; en el medio Sabouraud tampoco hubo conidiación (Fig. 37).

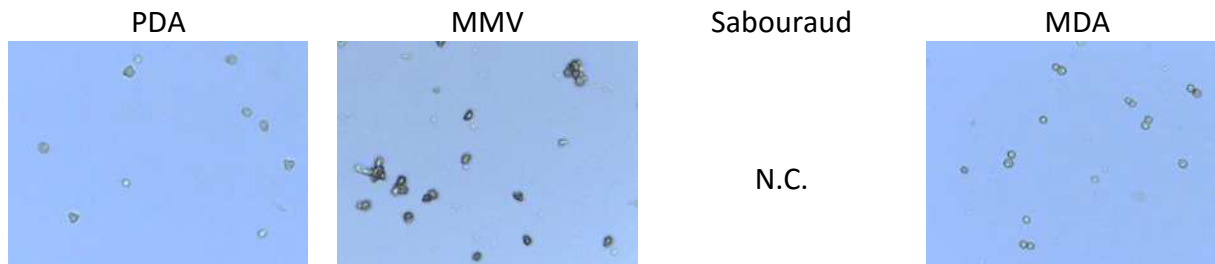


Figura 37. Micrografía de Conidias de *Umbelopsis sp. 75* de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X (No conidio N.C.)

d) *Fusarium oxysporum* (208)

F. oxysporum 208 muestra las conidias típicas del género (Fig. 38), con 2 septos, abundantes, variables en forma y tamaño, ovoides-elipsoidales a cilíndricas, que podrían alcanzar a formar macroconidios entre 3 y 5 septos y son ligeramente curvas, las cuales Vera (2007) describe como las características particulares de las conidias de *Fusarium*; en el medio PDA muestra la agrupación de coremium o sinema característica de los *Fusarium*, las cuales son asociaciones miceliales formadas por hifas delgadas formando un paquete parecido a un haz de trigo; para el medio Sabouraud la cepa no conidió probablemente a causa de lo antes mencionado. En el medio MDA se encontraron conidias, simples y con 2 o más septos. Es importante destacar que para este medio, MDA, no existe atracción alguna entre ellas. Por último, en el medio MMV las conidias en la imagen se aprecian aun jóvenes, sin embargo, se aprecian los septos en ellas, se aprecia ligeras agrupaciones entre ellas.

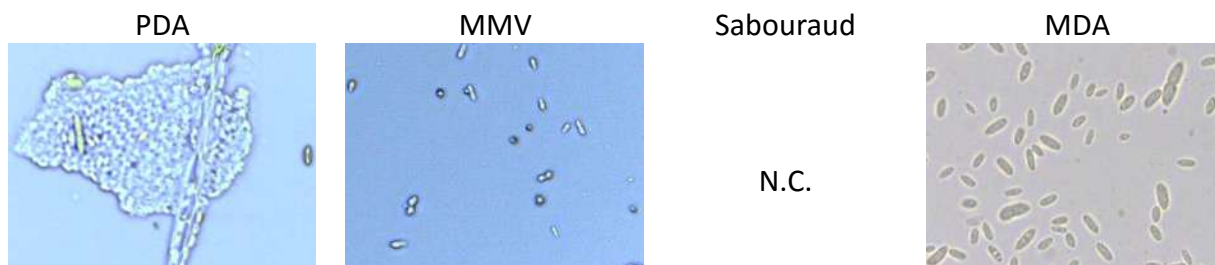


Figura 38. Micrografía de Conidias de *F. oxysporum* 208 de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X (No conidio N.C.)

e) *Pestalotiopsis sp.* (212)

Las conidias de éste género en los medios PDA, MMV y MDA son macroconidias de septos transversales de 2 hasta 4 septos, de coloración negro o café presentando 3 flagelos denominados sétulas, las cuales son las características de un *Pestalotiopsis* según Ulloa (1978); en el medio Sabouraud no se hicieron presentes las conidias, ya que éste medio no está diseñado para la esporulación (Fig. 39).

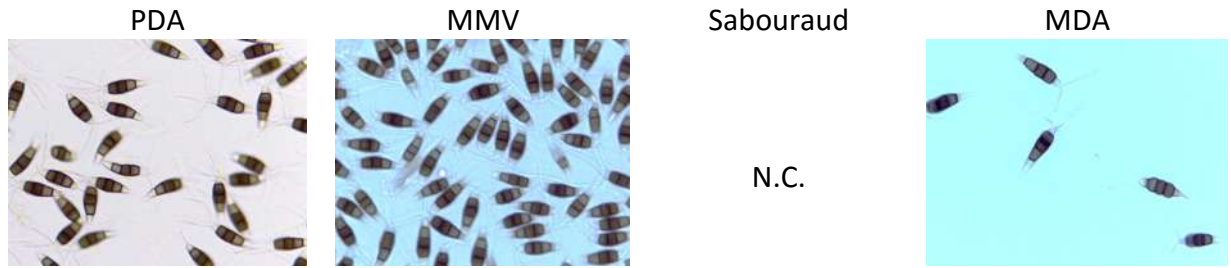


Figura 39. Micrografía de Conidias de *Pestalotiopsis sp. 212* de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X (No conidio N.C.)

f) Cepa 172

Las conidias de la cepa 172 son esféricas, globosas hialinas y de coloración verde, mostrando agrupaciones y conidias producidas en cadena, en los 4 medios distintos. Con esta descripción, se puede decir que tiene características del género *Penicillium* por lo que se sospecha que la cepa del 172 es un *Penicillium* (Fig. 40).

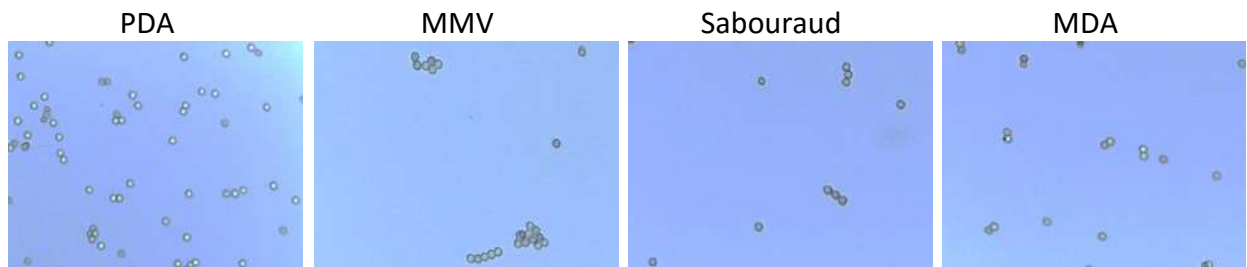


Figura 40. Micrografía de Conidias de la cepa 172 obtenidas en los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X

g) Cepa 205

Ésta cepa es un hongo con características parecidas a las de *Penicillium* en los 4 medios distintos, mostrando conidias producidas en cadena, globosas y esféricas, forman agrupaciones por interacciones en sus cargas, hialinas y con una coloración verde; por lo que también se trata de *Penicillium* (Fig. 41).

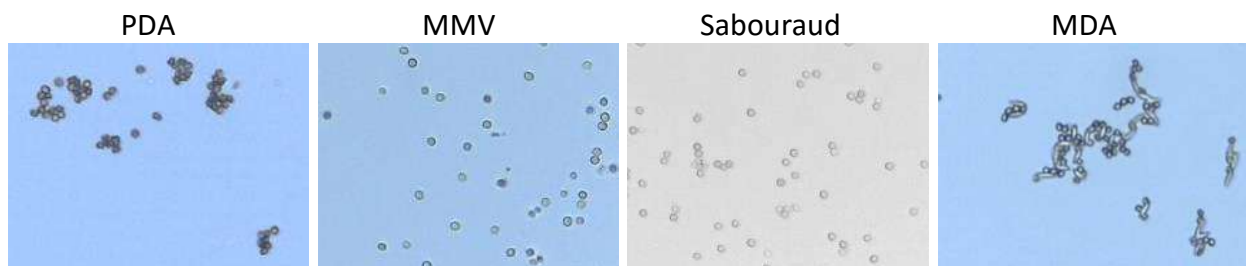


Figura 41: Micrografía de Conidias de la cepa 205 obtenidas de los diferentes medios observadas con el objetivo 40 X

7.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Se determinó la velocidad de crecimiento de las diferentes cepas y el tiempo que tardaban en conidiar.

Penicillium.

La cepa 23-AT 1812 tuvo una mayor velocidad de crecimiento. Sin embargo, un ANOVA de dos factores nos muestra que hay diferencias significativas en las velocidades de crecimiento debido a las cepas ($p=7.2872 \times 10^{-5}$), pero no debido a los medios de cultivo ($p=0.5564$). En lo que se aprecia una mayor diferencia es en el tiempo de conidiación, que es la parte de interés en este estudio. Se aprecia que la cepa 23-AT 1812 es la que presenta menor tiempo de conidiación, mientras que la cepa SG 18 A18 presenta un tiempo muy prolongado de conidiación. Dentro de cada cepa, los tiempos de conidiación son similares y el cambio de medio de cultivo no representa una reducción significativa en el tiempo en que se presentan las conidias (Tabla 10).

CEPA	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (Días ⁻¹)		TIEMPO DE CONIDIACIÓN (Días)
<i>Penicillium pencasmium</i> 05-ICH 1918	PDA	0,0332	3
	Vogel	0,0815	4
	Sabouraud	0,0406	4
	MDA	0,0460	3
<i>Penicillium sp.</i> 23-AT 1812	PDA	0,6599	2
	Vogel	0,3621	2
	Sabouraud	0,5892	3
	MDA	0,6327	3
<i>Penicillium sp.</i> SG-18 A18	PDA	0,0440	14
	Vogel	0,0468	13
	Sabouraud	0,0507	13
	MDA	0,0501	9
<i>Penicillium sp.</i> SG-30 181	PDA	0,0332	4
	Vogel	0,0368	4
	Sabouraud	0,0311	7
	MDA	0,0375	4
<i>Penicillium lilacionoechinulatum</i> SG-39 1918	PDA	0,0244	4
	Vogel	0,0454	6
	Sabouraud	0,0323	5
	MDA	0,0413	7

Pochonia.

En el caso de las cepas de *Pochonia* spp (Tabla 11), se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento para la cepa 97 en PDA y para la 215 en Vogel. Una prueba de t de medias apareadas (con $\alpha=$

0.05) mostró que no hay diferencias significativas en cuanto a la velocidad de crecimiento debido a la cepa ni al medio de crecimiento. La cepa 215 presenta una conidiación menor que la cepa 97.

Tabla 11. Cinéticas de crecimiento y tiempo de conidiación para las cepas del género <i>Pochonia</i>			
CEPA	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (Días⁻¹)		TIEMPO DE CONIDIACIÓN (Días)
<i>Pochonia sp. 97</i>	PDA	0,0523	8
	Vogel	0,0327	8
	Sabouraud	0,0239	11
	MDA	0,0240	8
<i>Pochonia sp. 215</i>	PDA	0,0325	1
	Vogel	0,0443	2
	Sabouraud	0,0368	2
	MDA	0,0419	2

Umbelopsis

En la tabla 12 observamos que para las cepas de *Umbelopsis sp.* las velocidades de crecimiento son muy parecidas. Una prueba de t para muestras apareadas ($\alpha=0.05$) mostró que efectivamente, no hay diferencias significativas en las velocidades de crecimiento debido a las cepas o los medios de cultivo. En cuanto a las velocidades de conidiación, fueron muy diferentes; son muy prolongados o no se presenta conidiación, sólo en medio Vogel se presentó conidiación en el mismo tiempo. Ninguna de las cepas presentó conidiación en el medio Sabouraud.

Tabla 12. Cinéticas de crecimiento y tiempo de conidiación del género <i>Umbelopsis</i>.			
CEPA	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (Días⁻¹)		TIEMPO DE CONIDIACIÓN (Días)
<i>Umbelopsis sp. 75</i>	PDA	0,0697	>25
	Vogel	0,0380	13
	Sabouraud	0,0522	N/P
	MDA	0,0293	>25
<i>Umbelopsis sp. 110</i>	PDA	0,0669	>25
	Vogel	0,0451	13
	Sabouraud	0,0801	N/P
	MDA	0,0361	>25

Fusarium, Pestalotiopsis, cepa 172 y cepa 205

Debido a que sólo se tiene una cepa de *Fusarium*, una de *Pestalotiopsis* y dos cepas de identidad desconocida, se hizo el análisis de manera conjunta. Por lo mismo que son diferentes, no se hizo un análisis conjunto; se puede observar que las velocidades de crecimiento son parecidas entre *Fusarium* y *Pestalotiopsis* y entre las cepas desconocidas. Ninguna de las cuatro cepas presentó conidiación o fue muy lenta en medio Sabouraud.

Tabla 13. Cinéticas de crecimiento y tiempo de conidiación de las especies <i>F. oxysporum</i> (208), <i>Pestalotiopsis sp.</i> (212) y dos cepas la 172 y la 205			
CEPA	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (Días⁻¹)		TIEMPO DE CONIDIACIÓN (Días)
<i>Fusarium oxysporum</i> 208	PDA	0,1702	3
	Vogel	0,1537	4
	Sabouraud	0,0595	N/P
	MDA	0,1238	4
<i>Pestalotiopsis sp.</i> 212	PDA	0,2274	9
	Vogel	0,0867	11
	Sabouraud	0,1395	N/P
	MDA	0,1416	8
Nombre clave 172	PDA	0,0218	6
	Vogel	0,0426	3
	Sabouraud	0,0289	12
	MDA	0,0456	6
Nombre clave 205	PDA	0,0486	7
	Vogel	0,0421	11
	Sabouraud	0,0495	12
	MDA	0,0319	7

7.3 ELECTROFEROGRAMAS

Los sobrenadantes de las suspensiones de conidias obtenidas como se mencionó en Materiales y Métodos, se analizaron a las 24 y 48 h. En las tablas que se muestran a continuación se indica, con una X, las condiciones en las que se obtuvieron señales electroforéticas. Lo que se pretende medir es la presencia de una señal sin alguna forma en particular.

7.3.1 ELECTROFEROGRAMAS DEL GÉNERO *Penicillium*

Cabe destacar que salvo la cepa de SG-30 181, las señales se producen preferentemente a las 48 h de suspensión y no existe un patrón que indique que en un medio de cultivo produzcan más o menos señales (Tabla 14).

TABLA 14. SEÑALES ELECTROFORÉTICAS DEL GÉNERO <i>Penicillium</i>			
<i>Penicillium pencasmium</i> 05-ICH 1918			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA		X	X
Vogel	X	X	
Sabouraud		X	
MDA		X	X
<i>Penicillium sp.</i> 23-AT 1812			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA	X	X	
Vogel	X	X	X
Sabouraud		X	X
MDA			X
<i>Penicillium sp.</i> SG-18 A18			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA		X	
Vogel		X	X
Sabouraud			X
MDA		X	X
<i>Penicillium sp.</i> SG-30 181			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA	X	X	X
Vogel	X	X	X
Sabouraud	X	X	X
MDA	X	X	X
<i>Penicillium lilacionoechinulatum</i> SG-39 1918			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA			X
Vogel	X	X	
Sabouraud		X	
MDA		X	X

7.3.2 ELECTROFEROGRAMAS DEL GÉNERO *Pochonia*

A 48 h y pH 6.8, se obtienen señales en todos los medios para ambas cepas. En el caso de la cepa 215, se observa el mismo comportamiento a pH 6.3. Con la cepa 97 no se obtienen señales en los medios PDA y Vogel a pH 6.3; estas diferencias son las que podrían usarse como herramienta de identificación o diferenciación de cepas (Tabla 15).

TABLA 15. SEÑALES ELECTROFORÉTICAS DEL GÉNERO <i>Pochonia</i>			
<i>Pochonia sp. 97</i>			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA	X	X	
Vogel	X	X	
Sabouraud	X	X	X
MDA	X	X	X
<i>Pochonia sp. 215</i>			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA		X	X
Vogel		X	X
Sabouraud	X	X	X
MDA	X	X	X

7.3.3 ELECTROFEROGRAMAS DEL GÉNERO *Umbelopsis*.

El género *Umbelopsis* produce señales en todas las condiciones probadas menos en Sabouraud ya que en este medio, el hongo no formó conidias (Tabla 16).

TABLA 16. SEÑALES ELECTROFORÉTICAS DEL GÉNERO <i>Umbelopsis</i>			
<i>Umbelopsis sp. 75</i>			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA	X	X	X
Vogel	X	X	X
Sabouraud			
MDA	X	X	X
<i>Umbelopsis sp. 110</i>			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA	X	X	X
Vogel	X	X	X
Sabouraud			
MDA	X	X	X

7.3.4 ELECTROFEROGRAMAS DE *F. oxysporum*, *Pestalotiopsis sp.*, cepa 172 y cepa 205

Fusarium produce señales preferentemente a pH 6.8, aunque a pH 6.3 presenta señales en PDA y MDA. En cuanto a *Pestalotiopsis*, produce señales en todas las condiciones cuando crece en PDA y Vogel y sólo a las 48 h en MDA (Tabla 17). Las cepas 172 y 205 tienen básicamente el mismo

comportamiento: producen señales a pH 6.8, pero a 6.3 sólo en Sabouraud y MDA. A diferencia de las dos primeras cepas, que no esporulan en Sabouraud, las cepas 172 y 205, si lo hacen en ese medio (Tabla 17).

TABLA 17. Señales electroforéticas presentes de las especies <i>F. oxysporum</i> (208), <i>Pestalotiopsis sp.</i> (212) y dos cepas la 172 y la 205			
<i>Fusarium oxysporum</i> 208			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA	X	X	X
Vogel	X	X	
Sabouraud			
MDA	X	X	X
<i>Pestalotiopsis sp.</i> 212			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA	X	X	X
Vogel	X	X	X
Sabouraud			
MDA		X	X
Clave 172			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA	X	X	
Vogel	X	X	X
Sabouraud	X	X	X
MDA	X	X	X
Clave 205			
	24 h pH 6.8	48 h pH 6.8	48 h pH 6.3
PDA	X	X	
Vogel	X	X	
Sabouraud	X	X	X
MDA	X	X	X

La información arriba mencionada para las diferentes señales producidas por las cepas probadas no puede compararse con datos de otros autores ya que este trabajo no había sido realizado con anterioridad.

7.4 IDENTIFICACIÓN

Ávila en el 2013 sugirió que existía una molécula de la pared celular que se liberaba en el sobrenadante de la suspensión de conidias de *Trichoderma atroviride* IMI 206040. Dicha señal la observo mediante electroforesis capilar usando polaridad inversa. En la Figura 42 A se observa que la señal obtenida es simétrica y bien definida usando buffer de fosfatos como buffer de corrimiento. El análisis de 4 diferentes cepas silvestres del mismo género usando el buffer de fosfatos (Figura 42 B) produjo señales adecuadas, con buena reproducibilidad. Debido a las características de *Trichoderma*, se pensó que la molécula que estaba produciendo tales señales pudiera melanina. Butler y Day (1998) describen 2 tipos de melanina, la que forma parte de la estructura de pared celular y la que se encuentra libre dentro de depósitos ubicados en la célula fúngica.

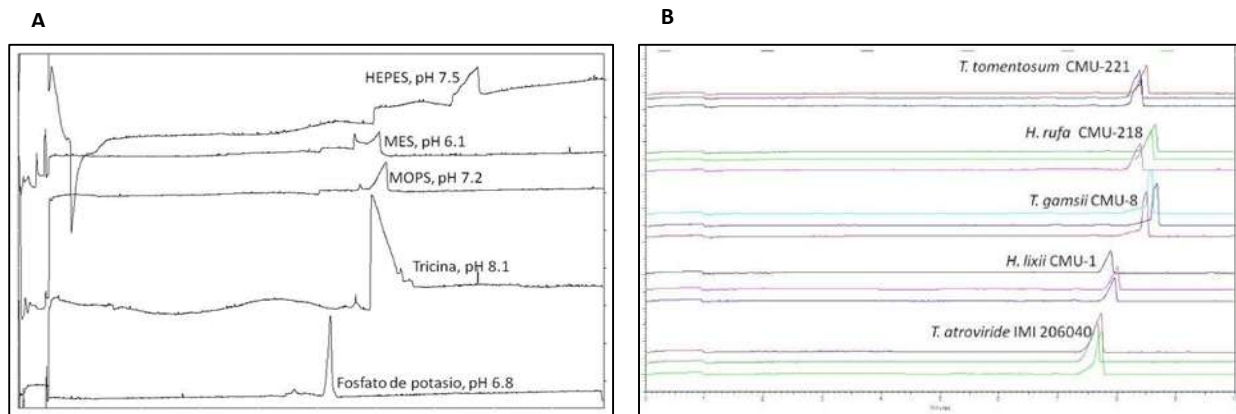


Figura 42: A. efecto del buffer en voltaje negativo sobre señales de conidias B. separación individual y en mezcla en voltaje negativo

Fuente: Avila, 2013

Sin embargo existen otros componentes de la pared celular los cuales pudieron dar dicha señal.

7.4.1 RELACIÓN GENERAL DE LOS ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS CON LOS DIFERENTES GÉNEROS

En este apartado se presentan los electroferogramas obtenidos para cada una de las cepas en los cuatro medios de cultivo ensayados.

Primeramente se muestra un electroferograma que contiene las señales más representativas de cada género ensayado (Figura 43), en el mismo electroferograma se indica el medio de cultivo. Las condiciones de análisis utilizadas fueron las mismas descritas por Ávila (2013). Con la finalidad de mejorar las señales obtenidas, el pH del buffer de corrimiento también se ensayó a 6.3. Se puede observar en la Figura que no se logran definir bien las señales, lo que podría lograrse usando otros buffers, a otras concentraciones y valores de pH. Sin embargo, se puede observar en la Figura 43 que todos los géneros producen señales entre 1 y 4 minutos, aunque *Pochonia* y *Fusarium* también produjeron una señal pequeña a los 12 minutos. Aun cuando producen señales en tiempos parecidos, la forma de cada una es diferente, condición que nos permite avanzar hacia el posible uso de estas condiciones para identificar géneros fúngicos.

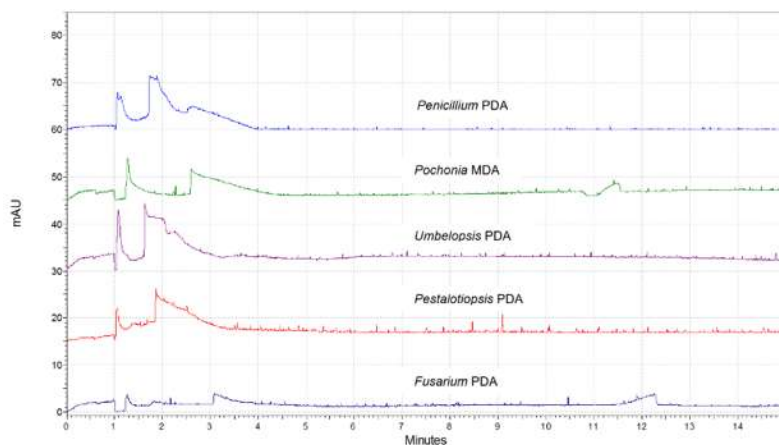


Figura 43: Electroferograma de las 5 cepas. Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

7.4.2 RELACIÓN ENTRE LOS ELECTROFEROGRAMAS DE LOS DIFERENTES MEDIOS Y LOS DIFERENTES GÉNEROS

En la Figura 44 observamos a los electroferogramas de las diferentes cepas y sus respectivos medios comparándolos entre sí para poder ver las diferencias significativas que muestran entre medios por cada uno de los géneros distintos. Podemos apreciar que cada electroferograma de los distintos géneros es diferente dependiendo el medio, esto es debido a que en cada medio de cultivo se encuentran diferentes nutrientes que afectan directamente a las conidias y al momento de llevar el análisis se ve reflejado en los electroferogramas. También podemos observar las diferencias que existen al comparar los electroferogramas de los géneros distintos en un mismo medio las cuales son significativas y específicas de cada género; por lo que podemos decir que si se analizan nuevamente los sobrenadantes de las conidias a las condiciones que se analizaron en este experimento ya sea obtenidas de uno de los 4 diferentes medios se obtendría

un electroferograma similar a los obtenidos en éste trabajo, por lo tanto podremos decir que se trata de un género en particular.

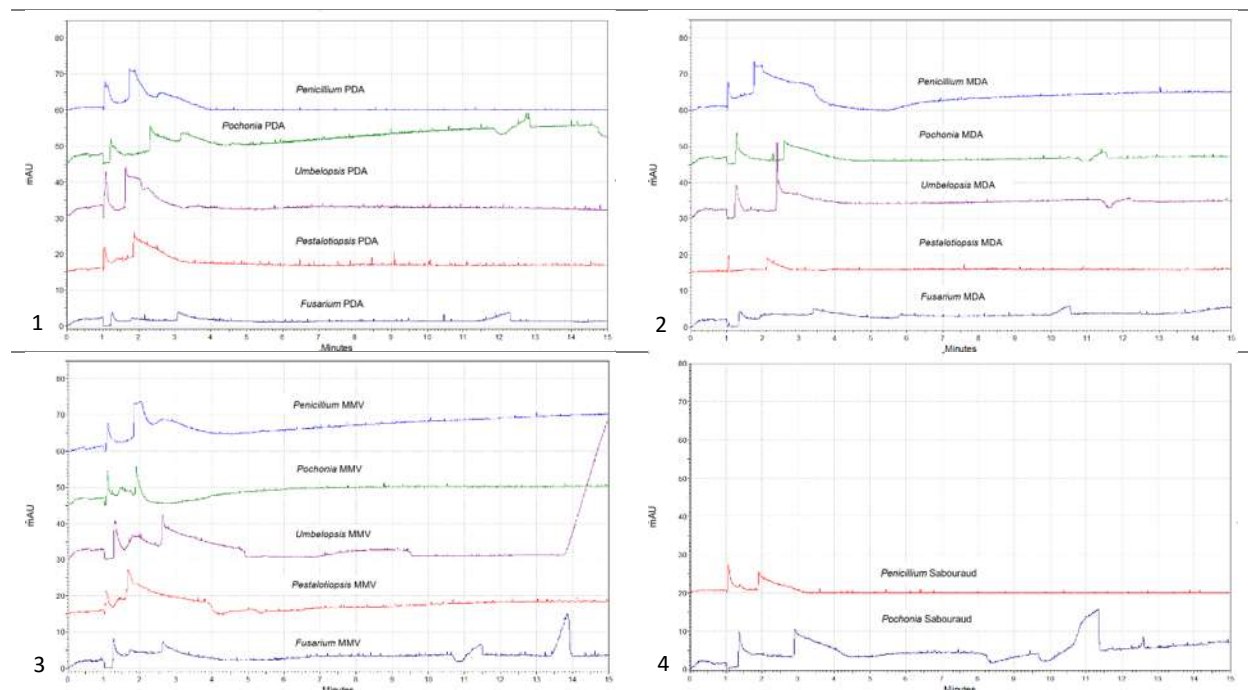


Figura 44: Electroferogramas de las 5 cepas y los 4 medios diferentes. 1. PDA, 2. MDA, 3. MMV y 4. Sabouraud a condiciones 48 h con pH 6.8 de buffer fosfato de potasio 10 mM

7.4.3 RELACIÓN DE LOS ELECTROFEROGRAMAS Y LOS DIFERENTES MEDIOS DE UN MISMO GÉNERO

Las señales electroforéticas se pueden ver afectadas entre distintos medios, esto es debido a que dependiendo de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, de los cuales el hongo se nutre, modificara de manera directa los componentes estructurales de la pared celular del hongo y por consecuencia los electroferogramas se verán modificados y arrojaran señales distintas entre medios aunque el hongo sea el mismo. Es por esto que se debe resaltar la importancia de las diferencias entre las señales de los diferentes medios.

Penicillium

El electroferograma siguiente (Figura 45) presenta los corrimientos electroforéticos de los distintos medios correspondientes a la cepa de *Penicillium*, presentando electroferogramas similares, más no iguales, entre los medios PDA, MMV y MDA; siendo el electroferograma Sabouraud el electroferograma distinto a los demás, presentando dos señales en un intervalo entre 1 y 3.1 min de tiempo de migración, la primera aguda con asimetría positiva y la segunda ancha con asimetría positiva prolongada. Lo que nos lleva a una identificación característica dependiendo del medio de cultivo seleccionado.

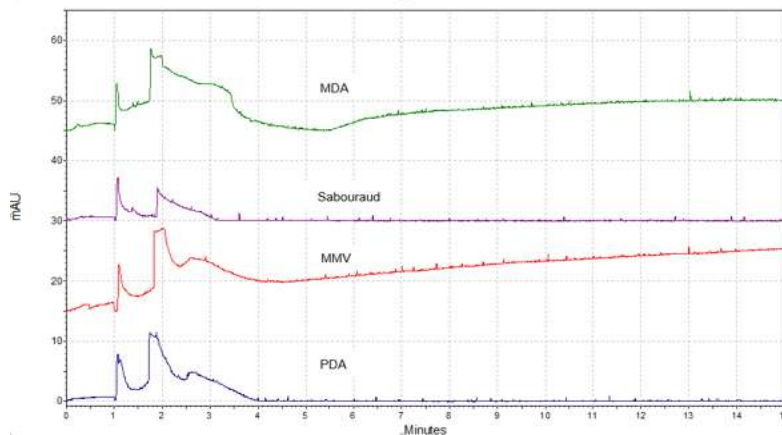


Figura 45: Electroferogramas de los 4 medios correspondientes al género *Penicillium*
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Pochonia

Pochonia presenta señales parecidas en los electroferogramas, sobre todo en las que se presentan entre los minutos 1 a 4, muy parecidos entre los medios PDA, Sabouraud y MDA. En el medio Sabouraud se presenta una señal grande entre los 11 y 12 minutos, diferente a las producidas en los otros medios de cultivo. Sin embargo, en medio mínimo Vogel se presentan dos señales agudas en el intervalo de 1 y 2.3 min de tiempo de migración, el segundo con asimetría positiva y entre estos dos picos una señal poco eficiente.

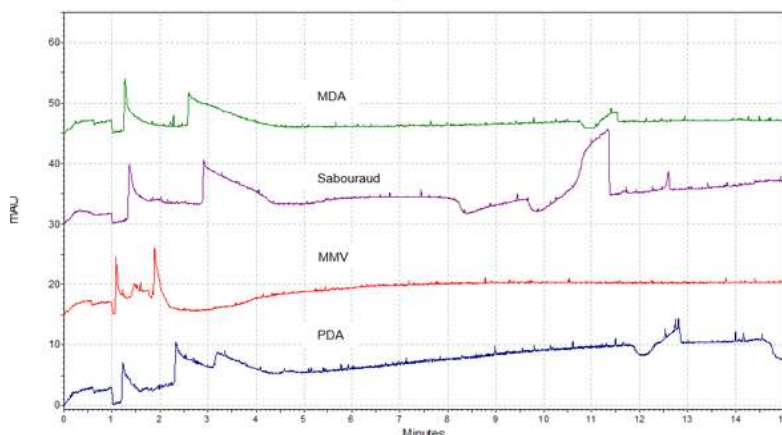


Figura 46: Electroferogramas de los 4 medios correspondientes al género *Pochonia*
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Umbelopsis

Umbelopsis sólo presenta 3 electroferogramas porque en medio Sabouraud no se presentó conidiación. Las señales de los electroferogramas son distintas entre sí aunque las señales se presentan principalmente en el intervalo de 1 y 3.5 min de tiempo de migración; en MMV se presenta una señal grande a partir de los 14 minutos.

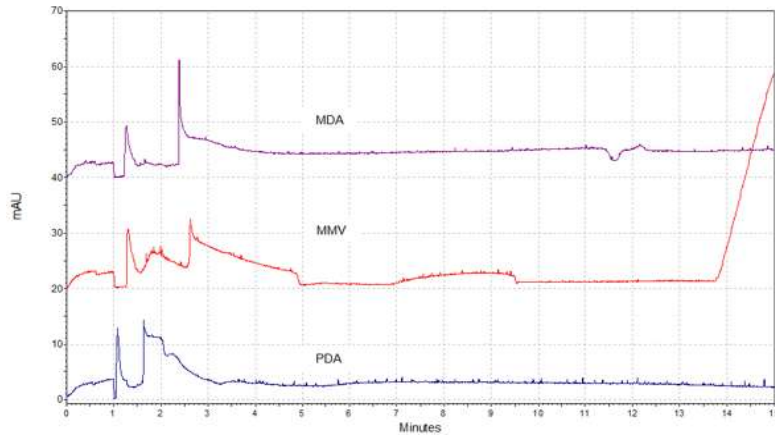


Figura 47: Electroferogramas de los 3 medios correspondientes al género *Umbelopsis*
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Pestalotiopsis

El género *Pestalotiopsis* tampoco desarrolló conidias en el medio Sabouraud. Las señales observadas en los tres electroferogramas tienen cierta similitud (Fig. 48), aunque también hay diferencias entre las señales.

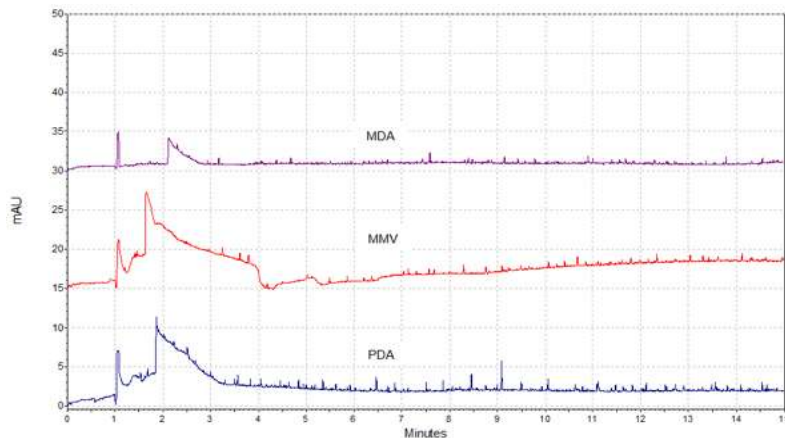


Figura 48: Electroferogramas de los 3 medios correspondientes al género *Pestalotiopsis*
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Fusarium

A diferencia de los demás géneros, *Fusarium* presentó diferencias más marcadas en sus electroferogramas. Aunque todos los electroferogramas tienen señales de 1 a 4 minutos, las señales más interesantes son las que se presentan a los 10 minutos para MDA, 14 minutos para MMV y 12 minutos para PDA. Estas diferencias podrían facilitar la identificación de este género.

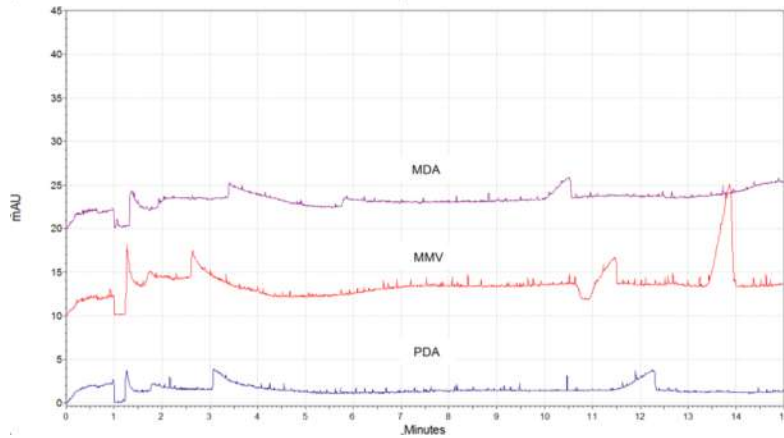


Figura 49: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *Fusarium*
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

En resumen, hace falta probar otras condiciones para asegurarse de que se obtienen mejores señales; sin embargo, de manera presuntiva, se puede apreciar que hay señales específicas para cada género y que el hecho de que se cultiven los hongos en diferentes medios, favorece que se presenten tales diferencias.

7.4.4 RELACIÓN ENTRE LOS ELECTROFEROGRAMAS DE LOS DIFERENTES MEDIOS Y LAS DIFERENTES ESPECIES

A) Cepas de *Penicillium*

En la Figura 50 se aprecian las señales producidas por todas y cada una de las cepas de *Penicillium* después de crecer en los cuatro medios de cultivo. Es interesante observar que para una misma especie, las señales son distintas de acuerdo al medio de cultivo. También se puede observar que hay cierta similitud en las señales cuando las diferentes cepas crecen en un mismo medio de cultivo. En el medio Sabouraud casi todas las señales se presentan planas mientras que en MMV se producen señales más interesantes por diferentes.

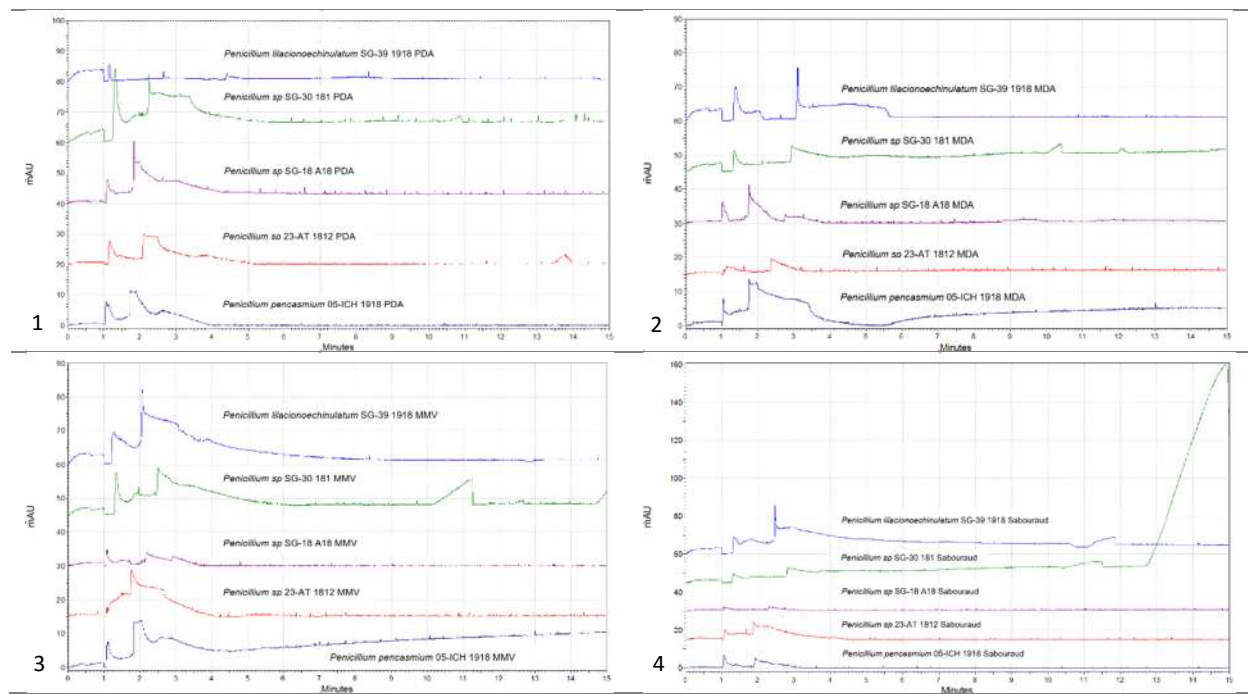


Figura 50: Electroferogramas de las 5 especies de *Penicillium* y los 4 medios diferentes. 1. PDA, 2. MDA, 3. MMV y 4. Sabouraud a condiciones 48 h con pH 6.8 de buffer

B) Cepas de *Pochonia*

Las especies del género *Pochonia* muestran electroferogramas similares al ser comparados entre medios; sin embargo, se pueden observar ciertas diferencias, sobre todo entre las dos especies estudiadas. Cabe señalar que en Sabouraud se obtiene una señal (minuto 11, aproximadamente) para la cepa 215 que no se presenta en las otras ni en los otros medio, situación interesante para diferenciar entre especies del género *Pochonia*. En los demás electroferogramas, las señales se observan entre los minutos 1 y 3.

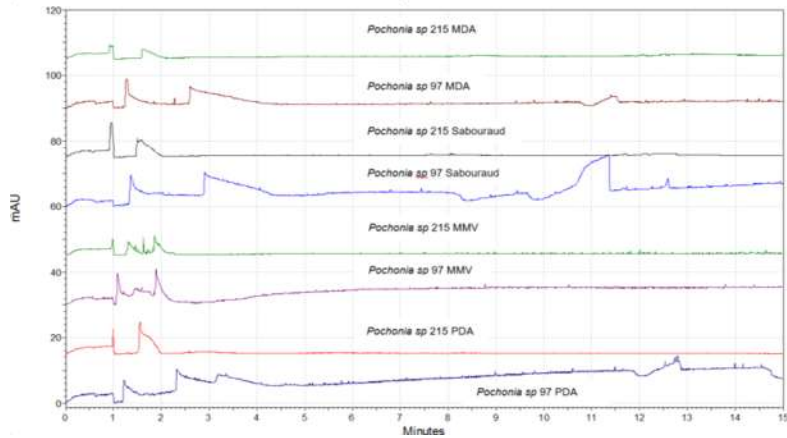


Figura 51: Electroferogramas correspondientes a las dos especies de *Pochonia* la 215 y la 97 en los 4 medios diferentes. Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

C) Cepas de *Umbelopsis*

En este caso, las señales producidas por las dos cepas de *Umbelopsis* son menos parecidas que en otros géneros. Se presentan señales dobles entre 1 y 3 minutos; en MDA presenta señales agudas, mientras que en MMV presenta una señal a los 14 minutos aproximadamente.

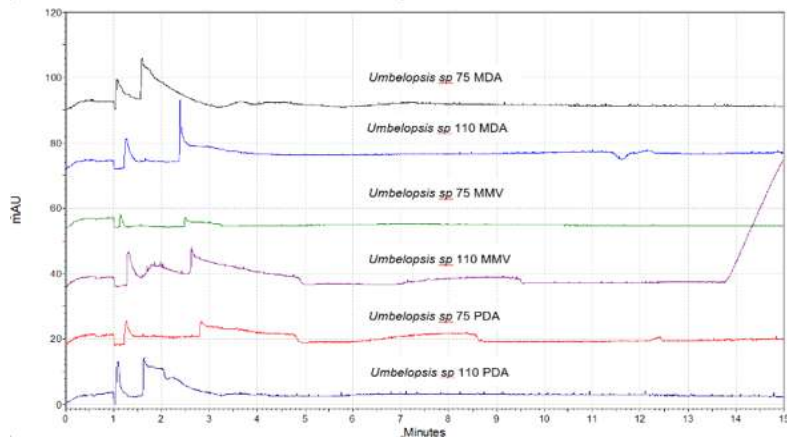


Figura 52: Electroferogramas correspondientes a las dos especies de *Umbelopsis* la 110 y la 75 en los 3 medios diferentes. Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

7.4.5 RELACIÓN ENTRE LOS ELECTROFEROGRAMAS Y LOS DIFERENTES MEDIOS DE UNA MISMA ESPECIE

A) Especies de *Penicillium*

Penicillium pencasmium 05-ICH 1918

La cepa *P. pencasmium* 05-ICH 1918 mostró señales en un intervalo de 1 y 4 min de tiempo de migración en los 4 distintos medios, siendo similares la señales de PDA y MMV, sin embargo, el

medio MDA presenta el mismo patrón que el PDA y MMV y el medio Sabouraud mostró señales ligeramente diferentes a las de los demás medios.

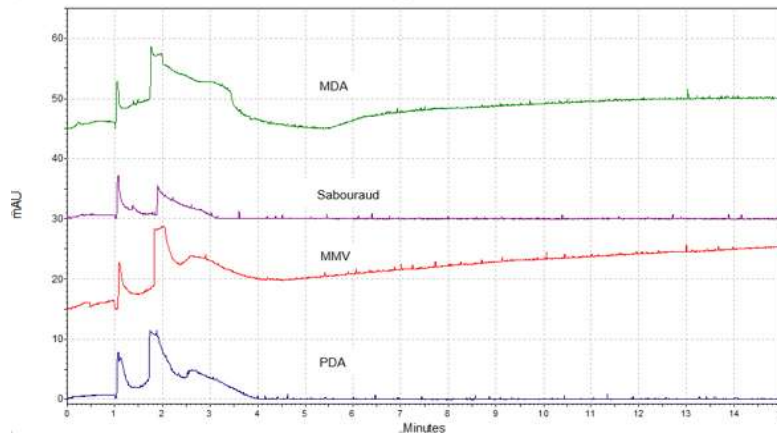


Figura 53: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *P. penicillium* 05-ICH 1918.
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Penicillium sp. 23-AT 1812

La cepa de *Penicillium* sp 23-AT mostró señales en un intervalo de 1.1 y 4.2 min de tiempo de migración en los 4 distintos medios, siendo los más similares el PDA y Sabouraud, sin embargo, el medio mínimo Vogel presenta ligeramente el mismo patrón que el PDA y Sabouraud ya por ultimo en medio MDA presento señales un poco diferentes a las de los demás medios.

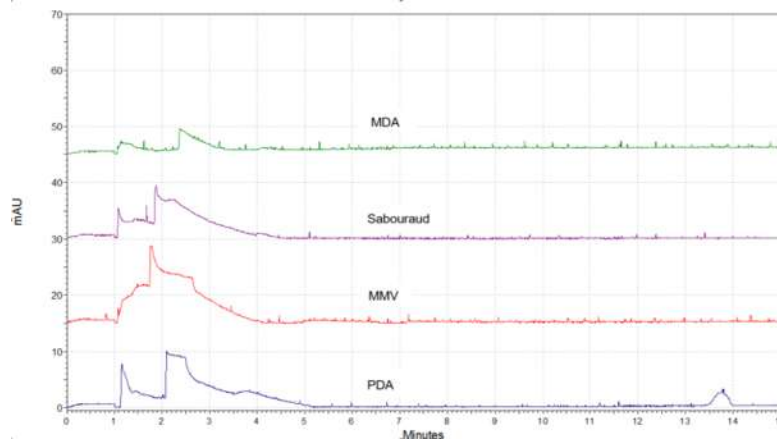


Figura 54: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *Penicillium* sp. 23-AT 1812.
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Penicillium sp. SG-18 A18

Para ésta especie de *Penicillium* muestra similitudes en electroferogramas correspondientes a los medios PDA y MDA de manera que presentan dos señales a los 1.1 y 1.8 min; también

presentan similitudes los electroferogramas correspondientes a los medios Sabouraud y medio mínimo Vogel en un intervalo de 1.1 y 2.7 min de tiempo de migración.

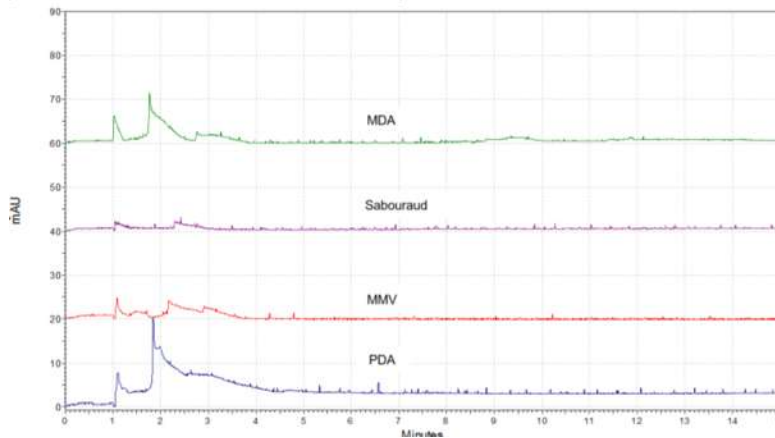


Figura 55: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *Penicillium sp.* SG-18 A18
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Penicillium sp. SG-30 181

En esta cepa los electroferogramas presentaron mayores diferencias entre cada uno de los distintos medios. MDA produce un electroferograma casi plano; Sabouraud produce una señal intensa de los 13 minutos en adelante aunque también presenta unas señales pequeñas entre 1 y 3 minutos, parecidas a las producidas por MMV y PDA; solo que en PDA las señales son agudas mientras que en MMV se presenta una señal pequeña a los 11 minutos.

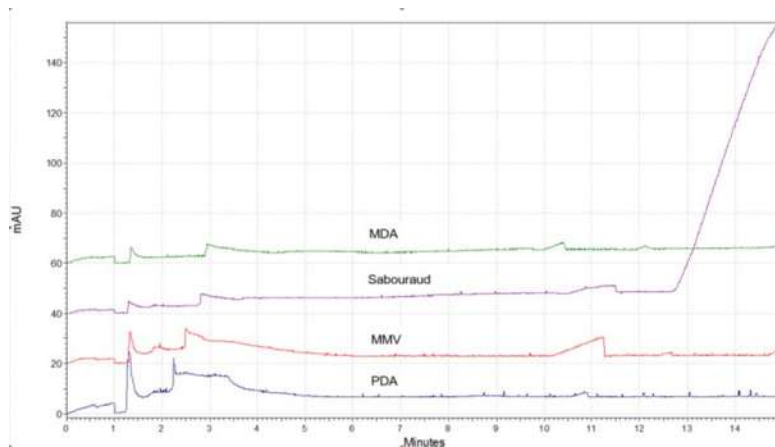


Figura 56: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *Penicillium sp.* SG-30 181
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Penicillium lilacionoechinulatum SG-39 181

Las formas de los picos son muy parecidas en MDA, Sabouraud y MMV, mientras que en PDA se obtiene una señal más bien plana.

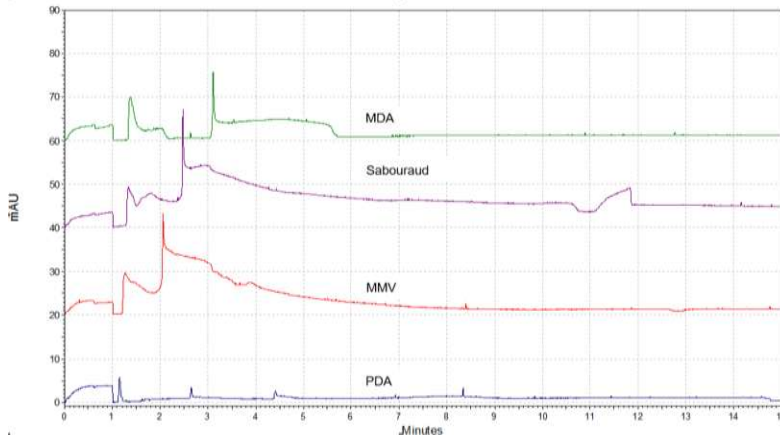


Figura 57: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *Penicillium* sp. SG-39 181
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

B) Especies de *Pochonia*

Pochonia sp. 97

En ésta cepa las señales mostradas resultaron similares entre los medios PDA, MDA y Sabouraud con señales entre 1.2 y 4.5 minutos de tiempo de migración y otra entre los 11 y 12 minutos, siendo la más diferente la señal del medio mínimo Vogel con una señal doble entre 1 y 2.2 min de tiempo de migración.

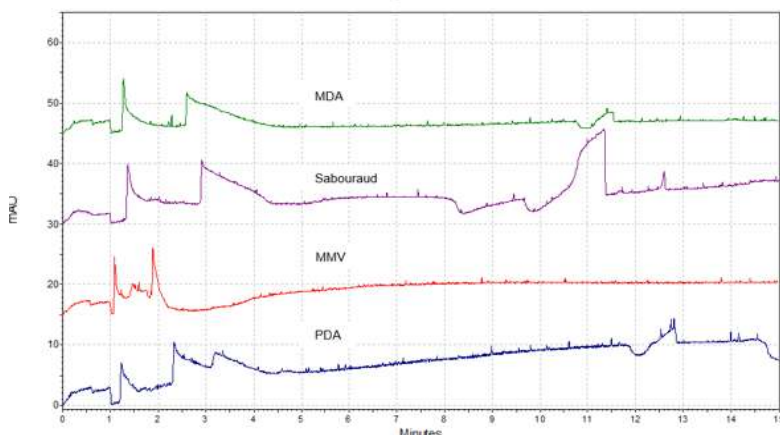


Figura 58: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *Pochonia* sp. 97
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Pochonia sp. 215

Sólo la señal en MMV es diferente a las demás ya que se presenta como una señal triple en lugar de doble como en el resto de los medios. En este caso, las señales se presentan entre uno y dos minutos.

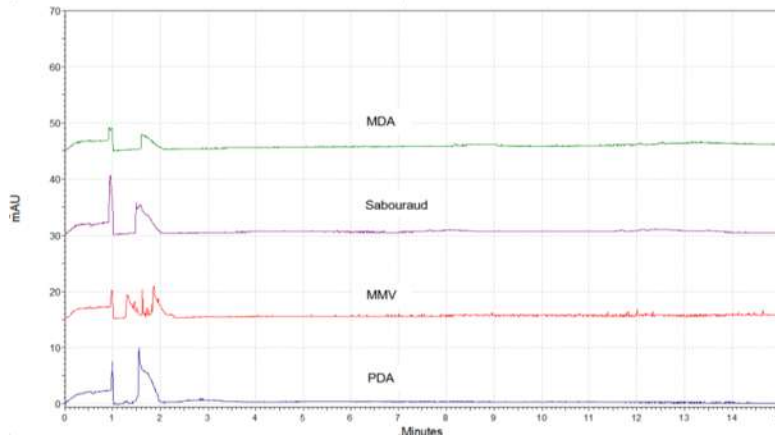


Figura 59: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *Pochonia sp. 215*
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

C) Especies de *Umbelopsis*

Umbelopsis sp. 75

En ésta cepa los electroferogramas resultaron similares, la diferencia más importante es en cuanto a la intensidad de las señales. Las señales se presentan entre 1 y 3 minutos, sólo en PDA hay otra señal a los 8 minutos, aproximadamente.

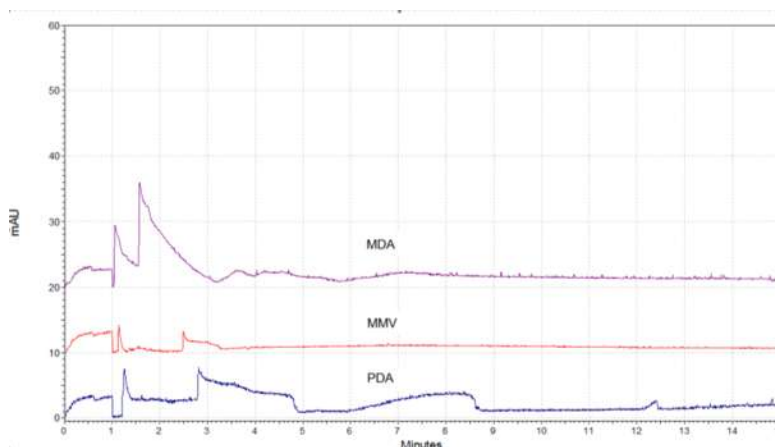


Figura 60: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *Umbelopsis sp. 75*
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Umbelopsis vinacca 110

En ésta cepa los electroferogramas las señales son distintas entre sí aunque las señales se presentan principalmente en el intervalo de 1 y 3.5 min de tiempo de migración, siendo una característica común en ellos, dos picos en el intervalo de señales; en el medio mínimo Vogel se hizo presente una señal grande a partir de los 14 minutos.

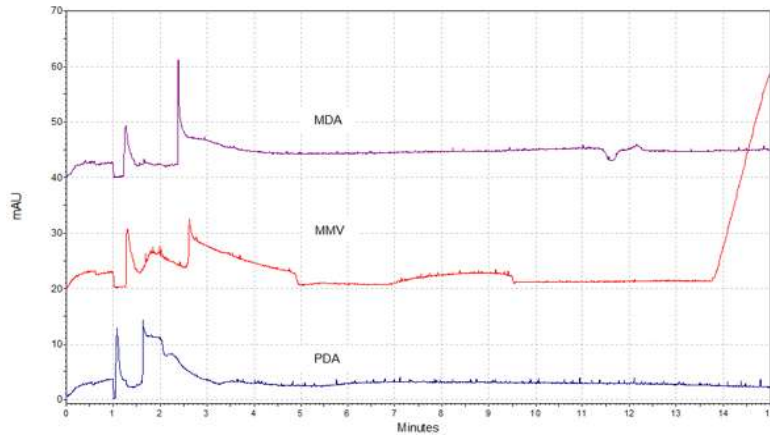


Figura 61: Electroferogramas de los medios correspondientes al género *Umbelopsis sp. 110*
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

En resumen, se puede observar que hay ciertas diferencias en las señales obtenidas para distintos medios en la misma especie. Como ya se ha mencionado, la obtención de mejores señales ayudaría a diferenciar entre diferentes géneros y/o especies fúngicas.

7.4.6 ELECTROFEROGRAMAS DE LAS CEPAS 172 Y LA 205

Cepa 172

La cepa 172 desarrolló conidias en todos los medios por lo que se tienen 4 electroferogramas. En todos los electroferogramas hay señales dobles, distorsionadas, entre los minutos 1 a 3; sin embargo, hay una señal específica a los 13 minutos en Sabouraud y otra mayor a 14 minutos en MMV. De acuerdo a la morfología micro y macroscópica, se piensa que esta cepa podría tratarse de *Penicillium*; sin embargo, las señales electroforéticas son diferentes.

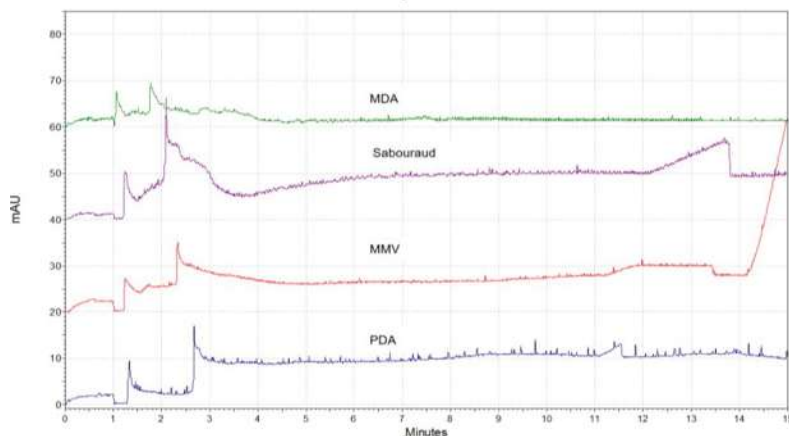


Figura 62: Electroferogramas de los medios correspondientes a la cepa 172
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

Cepa 205.

La cepa 205 mostró señales en un intervalo de entre 1 y 4 min de tiempo de migración en los 4 medios, con diferencias apreciables en las formas de dichas señales. En MMV se presenta una señal en un tiempo mayor a los 14 minutos. Comparando las señales de esta cepa con las producidas por la cepa 172, se aprecian diferencias en las formas de los picos.

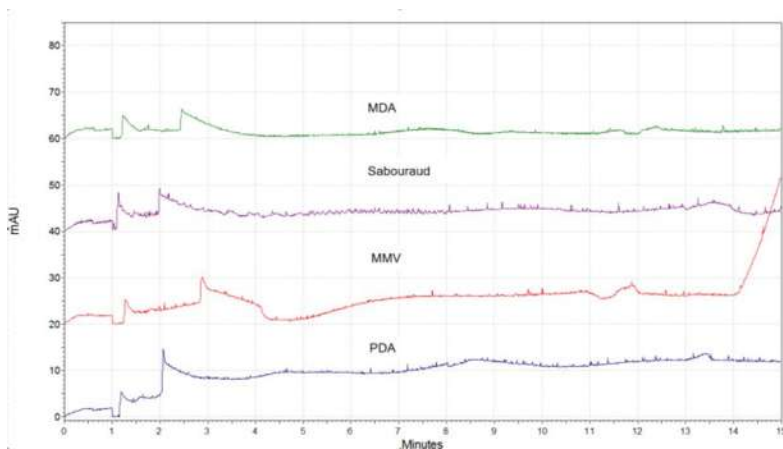


Figura 63: Electroferogramas de los medios correspondientes a la cepa 205
Buffer Fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8 y 48 h.

VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

- Taxonomía

Sí se presentaron diferencias morfológicas a nivel macroscópico en los 4 diferentes medios de cultivo y a nivel microscópico solo se presentaron ligeras diferencias en las conidias.

Cinéticas de crecimiento

Se encontró que después de realizar las pruebas ANOVA de dos factores y prueba de t de medias apareadas, las diferencias que se encontraron se debieron más que nada a la cepa que al medio de cultivo

- Condiciones de Análisis por EC

Las mejores condiciones que en general obtuvieron las mejores señales fueron a 48 h con pH 6.8 para todas las cepas de ensayo; sin embargo hubo algunas cepas que no solo a 48 h con pH 6.8 obtuvieron buenas señales, como lo el género *Umbelopsis* que obtuvo señales en las 3 diferentes condiciones que se analizaron.

- Señales electroforéticas

En general cada género y cada especie presentan rasgos distintivos que tienen que ver con el medio con el medio en el que crecen, sin embargo hay que mejorar las señales electroforéticas.



IX. CONCLUSIÓN

Los sobrenadantes de suspensiones de las especies fúngicas estudiadas produjeron señales electroforéticas que sugieren la presencia de un componente de pared celular liberado en el medio. Las señales producidas sí están relacionadas con el género y la especie fúngica así como con el medio en el que crecen; sin embargo, las señales deben mejorarse.

X. PERSPECTIVAS

Ensayar otras condiciones electroforéticas que conduzcan a mejorar las señales.

Extrapolar los análisis a otros géneros fúngicos para evaluar su aplicabilidad.

Identificar el componente que ocasiona la señal.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Quinta edición. Elsevier Academic Press. USA

Alena Kubátová, 2014. diark.org Umbelopsis isabellina B7317. [en línea] Disponible en URL: http://diark.org/diark/species_list?char=U# [Consulta: 07 de marzo de 2015]

Alexis Diomedi P., 2004. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. Santiago, Chile.

Andrii Gyganskyi, 2014. JOINT GENOME INSTITUTE [en línea] Disponible en URL: <http://genome.jgi.doe.gov/Umbra1/Umbra1.home.html> [Consulta: 07 de marzo de 2015]

Arauz Cavallini LP. 1998. Fitopatología un enfoque agroecológico, primera edición. Editorial de la universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Arévalo J., Hidalgo L., Martins I., F. Souza J., C. Castro J.M., D.G. Carneiro R. M. y S. Tigano M. 2009. Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, San José de las Lajas, Apartado 10, La Habana, Cuba, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología, 70770-917, Brasília, DF, Brazil, Embrapa Semi-Árido, 56302-970, Petrolina, PE, Brazil.

Arias Cifuentes E. L. y Piñeros Espinosa P. A. 2008. Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos de Muestras de Suelo de Los Paramos de Guasca Y Cruz Verde. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogota.

Arias Cifuentes, E. L. y Piñeros Espinosa, P. A., 2008. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Paramos de Guasca y Cruz Verde. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota, D. C.

Armstrong DW, He L. 2001. Determination of Cell Viability in Single or Mixed Samples Using Capillary Electrophoresis Laser-Induced Fluorescence Microfluidic Systems. *Anal Chem* 73: 4551-4557.

Armstrong DW, Schneiderheinze MJ, Kullman JP, He L. 2001. Rapid CE microbial assays for consumer products that contain active bacteria. *FEMS Microbiology letters* 194: 33-37.

Avila-Quintero JL. 2011. Hongos Fitopatogenos Aislados de Cultivar de Guayaba (*Psidium guajaba*): Sensible a Fungicidas y Caracterización Electroforética de Conidios. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Químico Farmacobiología. Morelia, Michoacán. México.

Bonifaz, A. 1998. *Micología Médica Básica*. 3ª edición. Editorial Méndez Editores S. A. de C. V.

Bonifaz, A. 2012. *Micología Médica Básica*. 4ª edición. Editorial McGraw-Hill.

CABI. 2015. CABI database [en línea] Disponible en URL: <http://www.speciesfungorum.org/> [Consulta: 06 de marzo de 2015]

Cañedo V. y Ames T. 2004. Manual de Laboratorio Para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.

Carlile, M., Watkinson, S., Gooday, G. 2006. The fungi. Segunda edición. Elsevier Academic Press. Londres. 588 pg.

Casado Río, Mercedes. 2014. Aplicaciones de la Electroforesis Capilar en el Estudio de Errores Congénitos del Metabolismo. Tesis Doctoral. Universidad autónoma de Barcelona Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de medicina. Barcelona.

Castagnino JM. Electroforesis capilar. 2000. Bioquímica. 25 (1):13-32

Cázares-García SV. 2007. Estudio de la Factibilidad del Análisis de Células Fúngicas por Electroforesis Capilar. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Químico Farmacobiología. Morelia, Michoacán. México.

Cázares-García SV. 2009. Movilidad Electroforética de Células Fúngicas. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México.

Desai MJ, Armstrong DW 2003. Separation, Identification and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis. Microbiology and molecular biology reviews 67 (1): 38- 51

Douglas A. Skoog, F. James Holler y Stanley R. Crouch, 2008. Principios de análisis instrumental 6ª Edición. Editorial Cengage Learning. México D.F.

EcuRed 2015. EcuRed *Alternaria alternata* [en línea] Disponible en URL: http://www.ecured.cu/index.php/Alternaria_alternata [Consulta: 02 de marzo de 2015]

EcuRed 2015. EcuRed *Penicillium* [en línea] Disponible en URL: <http://www.ecured.cu/index.php/Penicillium> [Consulta: 01 de marzo de 2015]

Elaine sala, Brian R. Kerry, H. Rosa Manzanilla-López, Gerald Mutua, Jean Devonshire, John Kimenju, Penny R. Hirsch. 2012. The *Pochonia chlamydosporia* Serine Protease Gene *vcp1* Is Subject to Regulation by Carbon, Nitrogen and pH: Implications for Nematode Biocontrol. PLoS One.

FINCH H., FINCH A. 1997. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. Segunda Edición. Editorial Trillas. México D. F. 188 pg.

Franco F., Cid del Prado I., Romero Ma. de la luz,. 2012 Aislamiento y Potencial Parasítico de un Aislamiento Nativo de *Pochonia chlamydosporia* en Contra de *Nacobbus aberrans* en Frijol. Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, Estado de México, México.

FUNDACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA *Penicillium* (link 1809) pdf, 4 paginas [en línea] Disponible en URL: <http://www.fba.org.ar/panel-gestion/InformeResultado/MI/mi31.pdf> [Consulta: 17 de febrero del 2015]

FUNDESYRAM, 2014. Los hongos de las plantas. [Base de datos en línea] Disponible URL: <http://www.fundesyram.info/biblioteca/displayFicha.php?fichaID=4157> [Consulta: 06 de Julio del 2015].

Gomez de Membrillera J. L. 1950. Claves Determinativa de las Especies del Género *Penicillium*. Universidad de Murcia, España.

GUZMAN, M. 1977. Micología médica. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 386 pg.

Hernández Borges, Javier. 2006. Nuevas Metodologías de Análisis de Pesticidas por Electroforesis Capilar. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna.

InfoEscolar, 2015. Quitina [en línea] Disponible en URL: <http://www.infoescola.com/bioquimica/quitina/> [Consulta: 28 de Abril del 2015]

M. Labarca, N. Sanabria y A. Arcia. 2006. Patogenicidad de *Pestalotiopsis palmarum* Cooke, sobre plantas de viveros de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.).

Montes de oca, N. 2004. Perspectiva para la fabricación de un Bionematicida a partir del hongo *Pochonia chalmydosporia*. CENSA. La Habana, Cuba.

Mueller, G., Bills, G., Foster, M. 2004. Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. Londres. 777 pg.

Pontón José, 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Universidad del País Vasco. España. [5 paginas]

PROMIP, 2011. Nematodo control biológico [en línea] Disponible en URL: <http://promip-controlbiologico.blogspot.mx/2010/11/nematoides.html> [Consulta: 07 de marzo del 2015]

R. Zare, W.Gams and H.C. Evans, 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophora*. Nova Hedwigia. 58 -76 pg.

Rivera Coto, G. 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología. 2ªEdición. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica.

Runmao Lin, Chichuan Liu, Baoming Shen, Miao Bai, Jian Ling, Guohua Chen, Zhenchua Mao, Xinyue Cheng, Bingyan Xie. 2015. Analysis of the complete mitochondrial genome of *Pochonia chlamydosporia* suggests a close relationship to the invertebrate-pathogenic fungi in Hypocreales. BioMed Central.

Santa Cruz Biotechnology, 2015. Product Block [en línea] Disponible en URL: <http://www.scbt.com/datasheet-205313-ergosterol.html> [Consulta: 28 de Abril del 2015]

Scribd, 2011. GLOMEROMYCOTA Y ASCOMICOTA [Base de datos en línea] Disponible URL: <https://es.scribd.com/doc/51949301/GLOMEROMYCOTA-Y-ASCOMICOTA> [Consulta: 06 de Junio del 2015].

Sierra Alonso I., Pérez Quintanilla D., Gómez Ruiz R. y Morante Zarcero S. 2010. Análisis Instrumental. 1ª Edición. Editorial Gesbiblo, S.L. España.

SS Tzean, TW Huang, 2003. BiotaTaiwanica *Umbelopsis isabellina* (Oudem.) W. Gams, 2003 [en línea] Disponible en URL: <http://myco.biota.biodiv.tw/pages/1214> [Consulta: 07 de marzo del 2015]

Tejeda, Ma. de la Luz. 2009. *Pochonia chlamydosporia* como agente de control biológico del nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* en el cultivo de frijol. Colegio de Posgraduados. México.

THE UNIVERSITY OF ADELAIDE 2015. Mycology online. [en línea] Disponible en URL: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/> [Consulta: 02 de Marzo de 2015]

Tresender KK, Lennon JT. 2015. Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. *Microbiology and Molecular Biology* 79: 243-262.

Ulloa M, Hanlin R. 1978. Atlas de micología básica. Editorial Concepto. México DF.

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA UCO. Aeromicología de Córdoba online. [en línea] Disponible en URL: <http://www.uco.es/aerobiologia/hongos/altern.htm> [Consulta: 02 de Marzo de 2015]

Vera D., Peña Venegas C., Cardona Vanegas G. 2007. *Fusarium* sp. Link 1809. <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=535&method=displayAT>

Wei JG, Xu T, Guo LD, Liu AR, Zhang Y, Pan XH. 2007. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of *Podocarpaceae*, *Theaceae* and *Taxaceae* in southern China. *Fungal Diversity*. 24: 55-74.

Ya-ning Wang, Xiao-young Liu, Ru-young Zheng, 2013. Four New Species Records of *Umbelopsis* (Mucoromycotina) from China. *Hindawi* [7 páginas].

Zain M. E., Razak A. A., El-Sheikh H. H., Soliman H. G. y Khalil A. M. 2009 Influence of growth médium on diagnostic characers of *aspergillus* and *penicillium* species. Botany and Microbiology Department, Faculty of Science, Al-Azhar University, Cairo, Egypt.