



**Universidad Autónoma del  
Estado de México  
Facultad de Ciencias**



**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CULTIVO *in vitro* DE UNA  
CEPA SILVESTRE DE *Cordyceps* sp., DEL ESTADO DE MÉXICO**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de Licenciada en  
Biología**

**Presenta**

**Alma Karina Moncivais Gómez**

**Directora: Dra. Cristina Burrola Aguilar**

**Codirectora: Dra. María Elena Estrada Zúñiga**

**El Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México. Junio 2021**

## Índice

Dedicatoria.....	2
Agradecimientos.....	3
Resumen .....	9
Abstract.....	
Introducción.....	11
Planteamiento del problema .....	20
Justificación .....	21
Objetivos.....	
Objetivo General.....	22
Objetivos particulares .....	22
Hipótesis .....	22
Método.....	23
Resultados.....	32
Discusión .....	50
Conclusiones.....	56
Referencias .....	58
Anexos .....	

## Tablas

Tbla 1. Caracterización macroscópica de la C3 de <i>Cordyceps</i> sp., en los diferentes medios de cultivo.....	33
Tabla 2. Caracterización microscópica de la cepa C3 en los diferentes medios de cultivo .....	36
Tabla 3. ANOVA del diámetro de las esporas de la cepa C3 de <i>Cordyceps</i> sp.....	39
Tabla 4. ANOVA del grosor de las hifas de la cepa C3 de <i>Cordyceps</i> sp., respecto a los diferentes medios de cultivo. ....	40
Tabla 5. Prueba de Tukey, prueba de rangos múltiples del grosor de las hifas de la cepa C3 de <i>Cordyceps</i> sp., por cada medio de cultivo. ....	
Tabla 6. Promedio de velocidad de crecimiento (mm/día) de la cepa C3, en los diferentes medios de cultivo.....	34
Tabla 7. ANOVA de la velocidad de crecimiento de la cepa C3 de <i>Cordyceps</i> sp., en los diferentes medios de cultivo.....	43
Tabla 8. Prueba de múltiples rangos para la velocidad de crecimiento de la cepa C3.....	43
Tabla 9. Peso (gr/) de la biomasa de la cepa C3 de <i>Cordyceps</i> sp. En los diferentes medios de cultivo.....	45
Tabla 10. ANOVA de la biomasa de la cepa C3 de <i>Cordyceps</i> sp., en los diferentes medios de cultivo.....	46
Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis para biomasa total por medio de cultivo.....	47

## Figuras

- Figura 1. Coloración del micelio de la C3 de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo. (A) medio Agar Agar, (B) medio Agar Papa Dextrosa, (C) medio Agar Extracto de Malta, (D) medio Saboraud, (E) medio Agua Agua y (F) <CDdmedio Trigo..... 34
- Figura 2. Caracterización microscópica de la cepa C3. (A) Peritecios, observados a 40x. (B) Esporas, en Trigo. (C) Hifas con terminación redondeada, en Saboraud. (D) Hifas y esporas en el medio Agar Extracto de Malta. (E) Ascosporas, en el medio Agra Papa Dextrosa. (F) Hifas en el medio de Trigo. Observación 100x a excepción de (A) 40x. Tinción con rojo Congo. Escala de las barras= 5 µm. .... 37
- Figura 3. Diagrama de caja y bigotes del diámetro de las esporas de *Cordyceps* sp., respecto a los diferentes medios de cultivo..... 39
- Figura 4. Diagrama de caja y bigotes del grosor de las hifas de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., respecto a los diferentes medios de cultivo. ....
- Figura 5. Diagrama de caja y bigotes de la velocidad de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., respecto a los diferentes medios de cultivo..... 44
- Figura 6. Diagrama de caja y bigotes: con muescas, de la biomasa de cepa C3 de *Cordyceps* sp., respecto a los diferentes medios de cultivo..... 48
- Figura 7. Cinética de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en el medio TR. ....
- Figura 8. Cinética de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en el medio SB. ....
- Figura 9. Cinética de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en el medio AA.....
- Figura 10. Cinética de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en el medio EMA. ...
- Figura 12. Cinética de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en el medio PDA. .49
- Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en todos los medios empleados. ....

## Resumen

*Cordyceps sensu lato* (s.l) es un grupo de hongos ascomicetos, patógenos de artrópodos y hongos. Este grupo ha sido escasamente estudiado en México; hasta ahora se han descrito 15 especies y para el Estado de México se tiene un registro de 3 especies. La importancia utilitaria grupo es principalmente alimenticia, medicinal y agronómica. A nivel mundial, el desarrollo del cultivo *in vitro* de *Cordyceps militaris* ha demostrado su potencial medicinal debido a que el micelio y los estromas producen biomoléculas con propiedades medicinales. Una de las variables independientes más analizadas en el cultivo de diferentes especies de *Cordyceps* es el medio de cultivo en donde se desarrollan, debido a que este es el que determina la óptima producción de biomasa y velocidad de crecimiento miceliar bajo diferentes fuentes de C/N. En el presente, se trabajó con una cepa obtenida por aislamiento vegetativo de un estroma de *Cordyceps* sp. colectado en el año 2017 en el Desierto del Carmen, Tenancingo, Estado de México. La cepa se caracterizó macroscópica y microscópicamente en diferentes medios de cultivo: Agar Agua (AA), Agar Extracto de Malta (EMA), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Sabouraud (SB), Agar Trigo (AT) y Agar Arroz (AAr). Posteriormente, se midió la velocidad de crecimiento durante 38 días y se cuantificó la biomasa. Por último, se analizaron los datos obtenidos con un ANOVA y una prueba de Tukey con un 95% de confianza en el programa Statgraphics Centurion VI.

Como resultados se obtuvo que, la cepa analizada mostró una mayor producción de biomasa en el medio de cultivo AT (0.314 gr), debido a la riqueza de carbono. En contraste, en el medio AA se observó la menor producción de biomasa (0.024 gr), a causa del déficit de nutrientes. La máxima velocidad de crecimiento se observó que el medio AAr (0.195 cm/día) y en el medio EMA se observó la menor velocidad de crecimiento (0.132 cm/día).

Se pudo observar que los medios de cultivo influyen en la producción de biomasa y velocidad de crecimiento, debido a las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno presentes en estos. Por lo que, de los diferentes medios de cultivo evaluados, el medio AT es el óptimo para la mayor producción de biomasa y el medio de AAr es el óptimo para la obtención de la mayor velocidad de crecimiento de la cepa de *Cordyceps* investigada.

**Palabras clave.** Caracterización, crecimiento miceliar, cultivo *in vitro*, medios de cultivo.

## **Abstract**

*Cordyceps sensu lato* (*s.l*) is a group of ascomycete fungi, pathogens of arthropods and fungi. This group has been scarcely studied in Mexico; so far 15 species have been described and for the State of Mexico there is a record of 3 species. The importance of this group is mainly nutritional, medicinal, and agronomic mainly. Worldwide, the development of the *in vitro* culture of *Cordyceps militaris* has demonstrated its medicinal potential because the mycelium and stromas produce biomolecules with medicinal properties. One of the most analyzed independent variables in the cultivation of different species of *Cordyceps* is the culture medium in which they develop, due to the optimal biomass production and mycelial growth with implemented carbon sources.

At present, we worked with a strain obtained by vegetative isolation of a *Cordyceps* sp., stroma. collected in 2017 in the Desert of the Carmen, Tenancingo, State of Mexico. The strain was characterized macroscopically and microscopically in different culture media: Water Agar (AA), Malt Extract Agar (EMA), Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Agar (SB), Wheat Agar (AT) and Rice Agar (AAr). Subsequently, the growth rate was measured for 38 days and the biomass was quantified. Finally, the data obtained were analyzed with an ANOVA and a Tukey test with 95% confidence in the Statgraphics Centurion VI program. As results the following were obtained, the analyzed strain showed a higher biomass production in the AT culture medium (0.314 gr), due to the richness of carbon. In contrast, in the AA medium there is the lowest biomass production (0.024 gr), due to the deficit of nutrients. The maximum growth speed shoots up than the AAr medium (0.195 cm / day) and the lowest growth speed shoots up in the EMA medium (0.132 cm / day).

It was observed that the culture media influence biomass production and growth speed, due to the sources of carbon and nitrogen present in them. Therefore, of the different culture media evaluated, the AT medium is the optimum for the highest biomass production and the AAr medium is the optimum for obtaining the highest growth speed of the *Cordyceps* strain investigated.

**Keywords.** Characterization, mycelial growth, *in vitro* culture, culture media.

## 1. Introducción

Los hongos son organismos heterótrofos muy diversos que han sido ampliamente utilizados en la industria para la producción de alimentos, medicamentos y textiles, entre otros (Cepero de García, *et al.*, 2012). Por su parte, los hongos entomopatógenos presentan un papel fundamental en el control de plagas de plantas ornamentales y de interés agroeconómico, además, algunas de estas especies han sido estudiadas y comercializadas debido a su valor nutricional y a sus propiedades medicinales (Hajek & Delalibera Jr., 2010; Shah & Pell, 2003).

Un hongo entomopatógeno es aquel que dentro de su ciclo de vida puede tener una fase en la que es patógeno de artrópodos. Estos hongos tienen un gran potencial como agentes de control biológico, ya que constituyen un grupo con más de 750 especies, la mayoría pertenecientes a los Zigomycota (Entomophthorales) y Ascomycota. Al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas en las poblaciones de insectos. Estos hongos inician su proceso infectivo cuando las esporas son retenidas en la superficie del integumento del insecto, donde se da la formación del tubo germinativo, y la excreta de enzimas como las proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas. Estas enzimas degradan la cutícula del insecto y coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio, que es una estructura especializada formada en el tubo germinativo. Una vez dentro del insecto, el hongo se desarrolla como cuerpos hifales que se van diseminando a través del hemocele e invaden diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días de iniciada la infección. Cuando el insecto muere y ya se han agotados muchos de los nutrientes que contiene, el hongo inicia su crecimiento micelar e invade todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de estructuras que van a producir nuevas esporas (Pucheta-Díaz *et al.*, 2006).

Por otro lado, *Cordyceps sensu lato* (*s.l.*) es un grupo de hongos ascomicetos entomopatógenos que parasita a diez órdenes de artrópodos a excepción del género

*Tolyocladium* que infecta a hongos del género *Elaphomyces* (Sung *et al.*, 2007). Actualmente, se encuentran registradas 574 especies (Index Fungorum, 2020).

Los hongos juegan un papel vital en el reciclaje de materia orgánica en la tierra. Además de eso, parasitan organismos vivos y causan diversas enfermedades en plantas, animales e insectos. Las estimaciones muestran que entre 750 y 1000 especies de hongos parasitan insectos de forma natural, aunque no se conoce completamente el alcance de la diversidad de los hongos entomopatógenos. Los hongos entomopatógenos pertenecen principalmente a dos grupos diversos dentro del reino Fungi, Entomophthorales (Phylum Entomophthoromycota, antes Zygomycota) e Hypocreales (Phylum Ascomycota). Estos hongos se encuentran distribuidos en amplios ecosistemas, incluidos el Círculo Polar Ártico y la Antártida. Los patógenos entomofthorales generalmente muestran un rango de hospedadores estrecho y se distribuyen en bosques templados y pocos registros en regiones tropicales. Los patógenos hipocreales, por otro lado, tienen un rango de hospedadores estrecho a muy amplio y se distribuyen predominantemente en los bosques tropicales húmedos. *Cordyceps sensu lato* (*s.l.*) es uno de los géneros hipocreales, que comprende más de 400 spp., que parasitan una amplia gama de insectos y pocos géneros de hongos. Externamente, producen estroma claviforme, cilíndrico o filamentoso delgado, filiforme en los hospedadores (Shrestha *et al.*, 2016).

Hasta la clasificación filogenética de Sung *et al.*, 2007, *Cordyceps* siguió siendo un gran género incluido en la familia Clavicipitaceae del orden Hypocreales. Sin embargo, los estudios filogenéticos demostraron que ni *Cordyceps* ni Clavicipitaceae eran monofiléticos, Sung *et al.*, 2007ab y, por lo tanto, *Cordyceps* se segregó en varios géneros filogenéticos dentro de tres familias de Hypocreales. Según la clasificación filogenética, *Cordyceps sensu stricto* (*s.s.*) ahora está restringido al clado que contiene la especie tipo *C. militaris*, circunscrito a Cordycipitaceae. Recién los géneros segregados *Ophiocordyceps* y *Elaphocordyceps* fueron colocado bajo otra familia Ophiocordycipitaceae; los otros dos géneros *Metacordyceps* y *Tyrannicordyceps* permanecieron en Clavicipitaceae *sensu stricto* (Sung *et al.*, 2007 & Kepler *et al.*, 2012).

Tras la reciente revisión del Código Internacional de la nomenclatura de algas, hongos y plantas (ICN), *Elaphocordyceps* ahora es sinónimo de *Tolyocladium* (Quandt *et al.*, 2014)



y *Metacordyceps* con *Metarhizium* (Kepler *et al.*, 2014).

Los géneros están relacionados con muchos géneros asexuales patógenos de insectos distribuidos en las tres familias Clavicipitaceae, Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae (Meyling *et al.*, 2012, Sung *et al.*, 2007a & Quandt *et al.*, 2014).

Los hongos *Cordyceps* varían en hábitat desde los aéreos hasta los epígeos y los subterráneos (Hajek, 1997), según sus respectivas especies hospedadoras. Cuando la etapa huésped es adulta, crecen en ambientes expuestos como hojarasca o se adhieren a algunas partes de la planta como hojas y ramas y en contraste con las etapas larvianas o pupa que están enterradas en el suelo (hipogeos) o en madera hasta casi 50 cm.

Los hongos patógenos a veces producen comportamientos de manipulación de parásitos en los hospedadores, como comportamiento de morder. Algunas de las hormigas parasitadas siempre muerden las venas laterales inferiores, pero nunca la lámina laminar o la superficie superior (Andersen *et al.*, 2009 & Hughes *et al.*, 2011).

La gama de hospederos de *Cordyceps* es muy amplia, incluye distintos órdenes de Artrópodos como Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Araneae, Diptera, Blattodea, Mantodea, Dermaptera, Odonata, Phasmatodea. Sin embargo, aproximadamente el 60% de las especies de *Cordyceps* (*s.l.*) presentan una mayor incidencia en los órdenes Coleoptera y Lepidoptera. Cerca del 95% de los hospederos del orden Lepidoptera son polillas y mariposas, en el orden Coleoptera son escarabajos; en sus estadios larval y pupal. Por el contrario, los hospederos de los órdenes Araneae, Diptera, Hymenoptera, Orthoptera, son parasitados en la fase adulta (Shrestha *et al.*, 2016).

*Cordyceps* (*s. l.*) presenta hábitos aéreos, epígeos y subterráneos, dependiendo de la especie que parasita; muestra una distribución cosmopolita en la cual se incluyen todas las regiones a excepción de la Antártida, no obstante, la mayor diversidad se encuentra en las regiones tropical y subtropical, como lo es el sur y sureste de Asia (Kobayasi, 1941, 1982; Samson *et al.*, 1988).

En México, *Cordyceps* (*s.l.*) es un grupo que ha sido poco estudiado en comparación con el continente asiático, su taxonomía ha sido explorada por Pérez-Silva (1977, 1978), Rubio-Bustos *et al.*, (1999) y Guzmán *et al.*, (2001). Los demás registros se han dado ocasionalmente y hasta la fecha no se ha realizado un estudio taxonómico dirigido al género *Cordyceps*. En todos los estudios la identificación taxonómica se ha realizado de forma

tradicional utilizando caracteres morfológicos, siendo nula la utilización de técnicas y herramientas moleculares.

En México, se han registrado 25 especies de *Cordyceps* (*s.l.*) que incluye estados asexuales y teleomorfos, de los cuales 9 especies pertenecen a *Cordyceps sensu stricto* (*s.s.*) (López, 2017).

Por otro lado, Pérez-Villamares *et al.*, (2017), menciona que el género *Cordyceps* (*s.l.*) ha sido poco estudiado en México, hasta la fecha se han descrito 15 especies; el Estado de México cuenta con un solo registro de la especie entomopatógena *Cordyceps militaris* y 2 especies parásitas de *Elaphomyces*: *Tolypocladium capitatum* y *Tolypocladium ophioglossoides*

El género *Cordyceps* (*s.l.*) presenta a nivel mundial importancia cultural, ecológica, económica y medicinal (Quandt *et al.*, 2014). La importancia medicinal y económica se debe a diferentes componentes químicos que produce este hongo. Los principales componentes bioactivos de *Cordyceps* son nucleósidos, polisacáridos y esteroides. Los nucleósidos, participan en la regulación y modulación de diversos procesos fisiológicos, como el sistema nervioso central. Por ejemplo, la cordicepina (3'-desoxiadenosina) posee acción antiinflamatoria y antitumoral gracias a su capacidad para sustituir a la adenosina, impidiendo así la síntesis de ARN. Los manoglucanos, exopolisacáridos, heteropolisacáridos y D-glucano, son polisacáridos con propiedades farmacéuticas: antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales, antimetastásicas, inmunomoduladoras, hipoglucémicas, esteroidogénicas e hipolipidémicas. Los esteroides como el ergosterol presentan actividad antitumoral y el D-manitol (sinónimo de ácido cordicéptico), presenta propiedades diuréticas, antitusivas y antioxidantes (Shashidhar *et al.*, 2013). También posee la capacidad de interferir en procesos bioquímicos y moleculares, incluida la biosíntesis de purinas y la síntesis de ADN/ARN (Shih *et al.*, 2007).

Dentro de *Cordyceps* (*s.l.*) se encuentra *Cordyceps* (*s.s.*), en dicha división está ubicada la especie modelo más estudiada hasta el momento *C. militaris*, así como también el material biológico del que se aisló la cepa con la que se trabajó en esta investigación; el cual fue caracterizado por López-Rodríguez en 2019, presentando un estado sexual: Estromas clavados y cilíndricos (longitud 20-102 mm, n=50) algunas ocasiones con una hendidura vertical en medio del estroma o bifurcados en la parte apical, solitario o gregarios, carnosos;

estípites alargados (5-85 mm, n=50) amarillo brillante (#FFFF00, #F3F781). Se observan cordones miceliarios blanquecinos del estroma al hospedero. Contexto compacto o cavernoso, peritecios ovoides y sub ovoides (196-1600 micras x 97-508 micras, n=152) completamente inmersos en el estroma. Ascas con maduración asincrónica, de forma cilíndrica (longitud: 223-805  $\mu\text{m}$ , n= 20; ancho 2.3-7.4 micras, n= 178). Con tapa apical bifurcada subglobosa (diámetro: 3-5  $\mu\text{m}$ , n=20). Las ascas maduras contienen ascosporas filiformes mutiseptadas (ancho: 0.4-1.5  $\mu\text{m}$ , n=100) que se desarticulan en partes de esporas de forma rectangular (2.1-8.1  $\mu\text{m}$  x 0.5-1.5  $\mu\text{m}$ , n= 134), en las ascas inmaduras no se observan las ascosporas y su morfología es similar a artrosporas, porque se separan, pero no se forman completamente septos. En algunos ejemplares los peritecios contienen estructuras fúngicas fusiformes irregulares (7.7-38.3  $\mu\text{m}$  x 2.1-9.4, n= 77).

Debido a los biocomponentes ya mencionados, a la importancia medicinal, al potencial como control biológico de plagas y al poco estudio de este grupo de hongos en México, se pretende estudiar su cultivo *in vitro*; para ello se hizo una previa caracterización de la cepa lo cual abarca, la evaluación de las características macro-micromorfológicas, velocidad de crecimiento y producción de biomasa de una cepa silvestre de *Cordyceps* sp., del Estado de México.

## Antecedentes

### 1.1. Aspectos taxonómicos

Los estudios taxonómicos de este grupo iniciaron con revisiones de ejemplares de diferentes herbarios de América del Norte y Europa por Kobayasi (1981, 1982), quien fue el primero en clasificar al género *Cordyceps* en tres subgéneros: *Eucordyceps*, *Neocordyceps* y *Ophiocordyceps* mediante caracteres morfológicos. Posteriormente, Sung *et al.*, (2007) realizaron un análisis filogenético en el cual utilizó 162 taxones basados en análisis que constaron de cinco a siete loci, incluidas las subunidades pequeñas y grandes del ribosoma nuclear (nrSSU y nrLSU), el factor de elongación 1 $\alpha$  (tef1), las subunidades más grandes y las segundas más grandes de la ARN polimerasa II (rpb1 y rpb2),  $\beta$ -tubulina (tub) y ATP6 mitocondrial (atp6), así como caracteres morfológicos (color, forma y consistencia del estroma) y propuso tres clados para *Cordyceps* (*s.l.*). Actualmente, los tres clados corresponden a las familias: Clavicipitaceae, Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae.

### 1.2. Aspectos de cultivo

Los hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* (*s.l.*) son reconocidos como fuentes potenciales para el control biológico de insectos plaga, producción de metabolitos de importancia médica, así como la obtención de colorantes naturales falta cita. La caracterización morfológica, velocidad de crecimiento, porcentaje de biomasa y sustrato en el que se desarrollan son los primeros pasos que permiten la utilización y potencialización de dichas especies, bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Existen diversos factores que influyen en el desarrollo de estos, entre los cuales están la temperatura, luz, humedad, pH, medios de cultivo, entre otros (Osorio, 2018).

Los medios de cultivo juegan un papel muy importante en el crecimiento micelial óptimo de diferentes especies de hongos. En el caso de las especies de *Cordyceps*, se utilizan diferentes tipos de medios de cultivo para el aislamiento, identificación, conservación y cultivo *in vitro*, por lo tanto, es de interés científico estudiar las características de crecimiento *Cordyceps* en

una variedad de medios de cultivo, a diferentes intervalos del período de incubación. Como resultado, se puede deducir la preferencia o afinidad a ciertos medios sobre otros para cumplir con los requisitos de crecimiento, cultivo, conservación a largo plazo, producción de estromas o para la producción de metabolitos secundarios (Shrestha *et al.*, 2006), los cuales son moléculas resultantes del metabolismo secundario. El metabolismo primario es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Por consiguiente, un metabolismo secundario permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, los cuales presentan propiedades biológicas, ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (García & Pérez-Urria Carril, 2011).

Wongsa *et al.*, (2005), trabajaron con la especie *C. unilateralis* aislándola en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) y reportaron que tanto la germinación de blastosporas como el desarrollo de un micelio ocurrió en 24 horas. Durante las primeras 2 semanas, el micelio joven era de color marrón cremoso con un reverso blanco. Más tarde, el micelio más viejo en el medio del reverso de la colonia se volvió negro parduzco después de 3-4 semanas. El peso seco del micelio aumentó con el tiempo y se observó un crecimiento exponencial después de 7 días de incubación. Luego, después de 21 días la formación del micelio disminuyó.

Shrestha *et al.* (2006) examinaron los patrones de crecimiento de los aislados de *C. militaris* en medios de cultivo, condiciones de luz y períodos de incubación diferentes. Encontraron que la luz es uno de los factores más críticos que determina la densidad, textura y pigmentación del micelio del hongo. Sin embargo, en condiciones de luz, el grado de pigmentación y la densidad miceliar se vieron afectados por el período de incubación y el tipo de medio. Independientemente del tipo de medio de cultivo y período de incubación, el micelio no presentó variaciones en la pigmentación, en condiciones de oscuridad. Por otro lado, el micelio creció más rápido en incubación oscura que en incubación con luz. En medios de cultivo nutricionalmente ricos como lo son Agar Dextrosa Sabouraud con Levadura (SDAY), Agar Maltosa Sabouraud con Extracto de Levadura (SMAY) y Agar

Czapek con Extracto de Levadura (CZYA) tanto la densidad del micelio como la pigmentación fueron más abundantes, esto sugiere que los medios ricos en nutrientes pueden cumplir con los requisitos para la propagación y crecimiento vegetativo del hongo.



Figura 1. *Cordyceps militaris* sin pigmentaciones de colonias de aislado EFCC C-7159-3 después de tres semanas de incubación en oscuridad en los diferentes medios de cultivo. Serie mediana (de arriba a la izquierda a abajo a la derecha): WA, MA, CMA, MEA, OA, PCA, V8, ES, CDA, MYA, HM, PDA, MCM, CDYA, MMM, MPDA, SMA, SDA, SDAY y SMAY. Nota: Falta YMA. Tomado de: Shrestha *et al.*, 2006.

Se ha encontrado que fuentes de carbohidratos como glicerol, glucosa, fructosa, galactosa, manitol, maltosa, sacarosa, celobiosa, glucógeno, almidón, fuentes de nitrógeno inorgánico, nitrato, amonio dan como resultado un crecimiento miceliar de *C. militaris* más abundante (Basith y Madelin, 1968).

Sung *et al.*, (2010), trabajaron con la especie *C. cardinalis*, observando la manera en la que influyen los efectos de diversas fuentes nutricionales y condiciones ambientales como la temperatura y el pH sobre su crecimiento miceliar. Emplearon Agar de avena, Agar peptona dextrosa y Agar de *Schizophyllum* (hongo) más extracto de levadura; dieron como resultado el mejor crecimiento miceliar. Tanto las fuentes de carbono, cereales, fuentes de nitrógeno, maltosa, avena, peptona como una temperatura de 25° C y un pH de 7 inducen un mejor crecimiento miceliar. Las sales minerales ayudan a aumentar la tasa de crecimiento, pero sólo dieron como resultado una densidad miceliar delgada, similar al Agar agua.

López (2017) caracterizó dos cepas de *Cordyceps* sp., denominadas cepa 1 y cepa 6. En cuanto a la caracterización macroscópica de las cepas, la cepa 1 presentó dos morfotipos, forma regular e irregular, convexa, borde fimbriado, algodonosa, color blanco en la superficie y amarilla en la parte basal; la cepa 6 presentó forma circular, convexa, borde fimbriado, crecimiento miceliar algodonoso y color blanca-crema en la parte superficial y en la parte basal amarilla. También menciona que dichas cepas presentan características macroscópicas similares a las cepas de *C. militaris* como textura algodonosa, borde fimbriado, crecimiento aéreo y convexo, así como coloración blanca-amarilla. En cuanto a la densidad del micelio, en ambas cepas en condiciones de luz fue menor en el medio (AA), poco en (PDA) y (EMA), moderado en Papa Dextrosa adicionado con Levadura (PDA+Y) y (SB). En condiciones de oscuridad, menor en (AA), moderado en (PDA) y (EMA), abundante en (PDA+Y) y (SB), ya que el contenido nutricional de los medios influye directamente en la densidad del micelio, así como los medios de cultivo ricos en nitrógeno o en condiciones de oscuridad a comparación de los medios en presencia de luz.

Con respecto a la coloración de las cepas, esta fue diferente de acuerdo con la presencia y ausencia de luz, a excepción del medio AA, en la que en ambas condiciones el micelio se observó blanquecino. En los medios (PDA), (EMA), (PDA+Y) y (SB), se visualizaron pigmentaciones amarillentas en condiciones lumínicas y blanquecinas en condiciones ausentes de luz.

En cuanto a la velocidad de crecimiento, esta fue diferente respecto a los medios de cultivo, siendo mayor en la cepa C-1 (0.23cm/día y 0.22cm/día), en ausencia y presencia de luz con el medio de cultivo (PDA+Y), la menor velocidad de crecimiento se observó en la cepa C-6 en condiciones de oscuridad en (PDA), lo cual corrobora que existe una interacción significativa entre cepa-luz y entre cepa-medio de cultivo.

Osorio-Posada (2018), evaluó la morfología, efectos de la luz y medios de cultivo durante el crecimiento miceliar *in vitro* de *Cordyceps* sp., parasitando a crisálidas (fase de desarrollo posterior a la forma de larva y anterior a la forma adulta) de lepidópteros. Incubó el hongo a  $27 \pm 2$  °C durante ocho semanas bajo condiciones de luz visible y oscuridad constantes en diecisiete medios, algunos suplementados con integumento de pupa de lepidópteros, y comparó el desarrollo de la pigmentación, densidad, textura miceliar, y la tasa de crecimiento diametral. Encontró una pigmentación intensa en las colonias que crecieron bajo condición

constante de luz que aquellas dispuestas en oscuridad siendo indiferente la composición nutricional del medio. La densidad y la textura miceliar fueron de moderada a abundante y de semialgodonosa a algodonosa, respectivamente, para casi todos los medios en ambas condiciones, excepto en aquellos que contenían bajas concentraciones de carbono y que presentaron una densidad pobre y textura lisa.

La tasa de crecimiento diametral (mm/semana) en función de las condiciones de luz-oscuridad y del medio de cultivo mostró un rápido crecimiento en las colonias cultivadas bajo oscuridad; sin embargo, el integumento favoreció el crecimiento en los medios que se suplementaron con éste. Finalmente, encontró que existen diferencias entre las condiciones de luz-oscuridad principalmente, y después entre medios de cultivo.

## 2. Planteamiento del problema

La demanda comercial de *Cordyceps* (*s.l.*) (Ascomycota: Hypocreales), ha ido en aumento y esto ha provocado que la obtención natural de dichas especies disminuya en un 70% comparado con el año 1978 en China, de acuerdo con lo expuesto por (Li *et al.*, 2006).

Este grupo de hongos presenta aportes benéficos tanto para la salud como para el ambiente, por ejemplo, las especies *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*, se reproducen de manera asexual y se han empleado exitosamente como controladores de insectos plagas (Vega *et al.*, 2012; Jaronski, 2014). Otro ejemplo es el de *Ophiocordyceps sinensis* que se ha usado en la medicina tradicional China como vigorizante y para tratar desordenes hepáticos desde el siglo XVIII (Mizuno, 1999; Zhou *et al.*, 2009; Lo *et al.*, 2013). Por su parte, *Cordyceps tenuipes*, es un alimento tradicional muy apreciado en Corea, debido a su gran contenido de proteínas y nucleósidos (Hong *et al.*, 2007).

En Asia, estos hongos son conocidos como alimentos nutraceuticos (un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades) (Leonard, 2006; Rojas *et al.*, 2015).

En Latinoamérica, especies como *Tolyocladium capitatum* y *Ophiocordyceps unilateralis*



han sido utilizadas por comunidades aborígenes y campesinas en ceremonias curativas y con fines alimenticios (Heim y Wason, 1958; Vasco-Palacios *et al.*, 2008).

En México, el estudio de *Cordyceps* sp., es escaso, el conocimiento sobre la diversidad y la taxonomía de las especies de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* s. l. es el reflejo de la ausencia de exploraciones en campo para este grupo de hongos en particular (Pérez-Villamares *et al.*, 2017).

En México, debido a los pocos estudios sobre investigaciones biotecnológicas, existen muchos huecos sobre el comportamiento de la cepa de *Cordyceps* sp., así como también los diferentes medios que potencializan su cultivo.

### **3. Justificación**

Los hongos juegan un papel fundamental en la naturaleza. Se estima que el 80% de las plantas vasculares están asociadas a hongos sin los cuales no resistirían ciertas inclemencias del tiempo, como la sequía o la falta de nutrientes en el suelo, o serían más sensibles al ataque de bacterias o insectos (Alcántara, 2010), asimismo, son descomponedores, recicladores de materia orgánica, regulan la liberación de nutrientes, producen sustancias como los metabolitos que pueden ser enfocados al ámbito médico (Cuevas-Moreno, 2016). Son agentes de control microbiológico de plagas agrícolas (Jaronski, 2014) productores de pigmentos naturales de utilidad industrial (Mata-Gómez *et al.*, 2014), y no de menor valor como alimento y fermentadores de bebidas (Bourdichon *et al.*, 2012).

Por otro lado, el conocimiento de *Cordyceps* (s.l.) por parte de diferentes culturas ha propiciado en los últimos años un desarrollo rápido de la investigación sobre los verdaderos efectos medicinales de estas especies, sin embargo, en México su conocimiento aún es escaso, es por ello que en esta investigación como primer paso se pretende iniciar el cultivo *in vitro* de una cepa silvestre de *Cordyceps* sp., que implica su aislamiento, cultivo y caracterización, así como para conocer el efecto del medio de cultivo sobre la producción de biomasa y velocidad de crecimiento, ya que esto permite seleccionar los medios que potencializan su cultivo y producción. Y como segundo paso, contribuir en futuras

investigaciones con enfoque biotecnológico.

## 4. Objetivos

### Objetivo General:

Caracterizar morfológicamente una cepa silvestre de *Cordyceps* sp., del Estado de México y en un cultivo *in vitro* determinar el efecto del medio de cultivo sobre la producción de biomasa y velocidad de crecimiento.

### Objetivos particulares:

1. Identificar las características macroscópicas y microscópicas de una cepa silvestre de *Cordyceps* sp.
2. Cuantificar la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa de una cepa silvestre de *Cordyceps* sp., en función de diferentes medios de cultivo.

## 5. Hipótesis

La cepa aislada a partir de *Cordyceps* sp., presentará una mayor velocidad de crecimiento y un mayor porcentaje de biomasa, en medios de cultivo ricos en nitrógeno y carbohidratos, por lo tanto, la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa serán mayores en el medio Sabouraud (SB), ya que este medio presenta altos contenidos de los elementos ya mencionados.

## 6. Método

### 6.1. Material biológico

Se trabajó con una cepa obtenida previamente por aislamiento vegetativo de un estroma (figura 3) de *Cordyceps* sp., (del estroma recolectado se obtuvieron más cepas, no obstante, en esta investigación solo se trabajó con una de ellas, la cual tiene el número 3)., colectado en el Desierto del Carmen en Tenancingo, Estado de México. La identificación del estroma se hizo mediante el uso de las claves taxonómicas de Mains (1958) y Kobayasi (1982).

La cepa se resguardo en el laboratorio de micología del Centro de Investigación en Recursos Bióticos.

La reactivación de la cepa (figura 4) se realizó mediante un aislamiento en el medio de cultivo Agar Papa y Dextrosa (PDA), a una temperatura de 25 °C en la incubadora bacteriológica por siete días bajo condiciones estériles.

## 6.2 Zona de recolecta

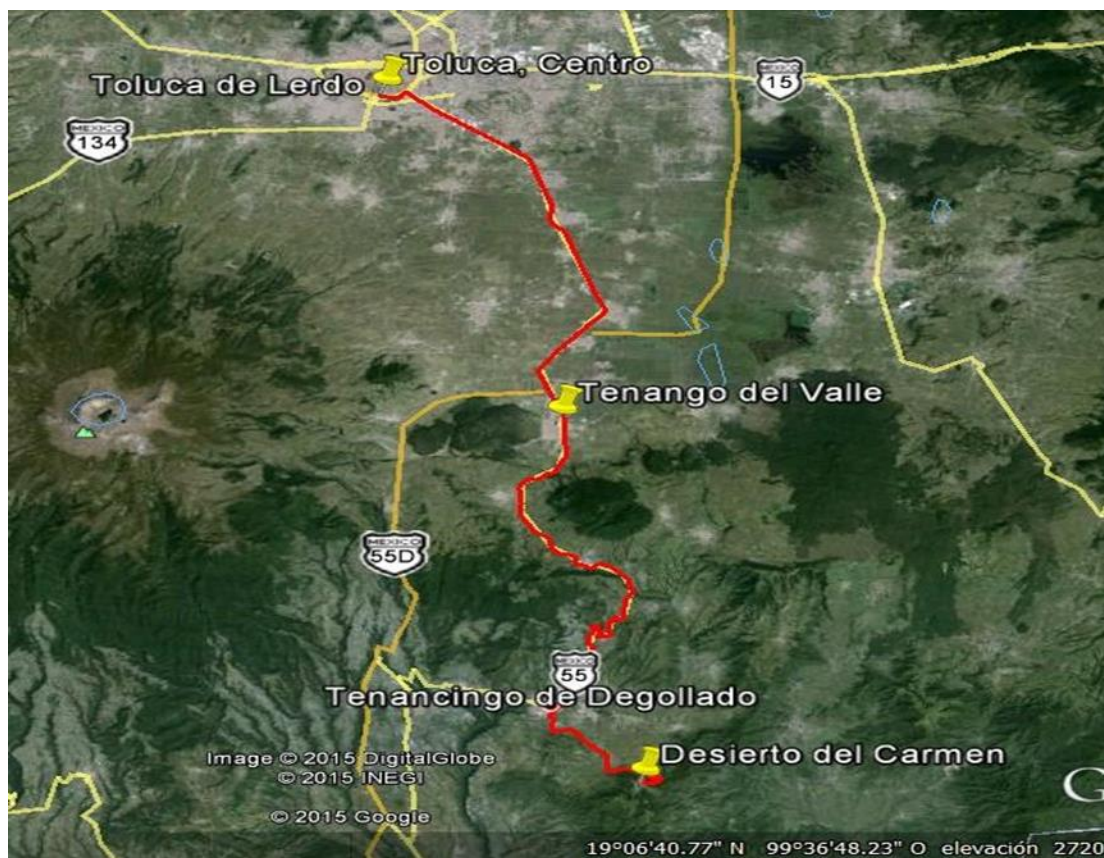


Figura 2. Ruta de acceso al Santo Desierto del Carmen. Tomado de Cortina-Martínez, 2018.

Se localiza geográficamente entre los meridianos de coordenadas  $99^{\circ} 35'' 37'$  de longitud Oeste y entre los paralelos  $185741$  de latitud Norte. Cartográficamente, el parque se sitúa en la carta topográfica a escala 1:50000; denominada Tenancingo E14-A58 (INEGI, 2020). El municipio de Tenancingo se ubica en la zona sur del Valle de Toluca y sus límites municipales son los siguientes: al norte con los municipios de Tenango del Valle y Joquicingo; al sur con Zumpahuacan; al oriente con Malinalco; y al poniente con Villa Guerrero. Tiene un rango altitudinal que va de los 1,940 a los 2,440. La localidad del Carmen se localiza al sureste de la cabecera municipal de Tenancingo (Vargas, 1997).

## **Geomorfología**

El municipio se encuentra asentado en una zona donde convergen dos grandes sistemas fisiográficos, los cuales son:

- 1) La parte norte conformada por la provincia del eje volcánico, específicamente a las ramificaciones del volcán Xinantecátl o Nevado de Toluca, que pertenece a la subprovincia de lagos y volcanes del Anáhuac y que pertenecen a la cuenca del Río Lerma.
- 2) La porción sur correspondiente a la provincia de la sierra madre del sur, subprovincia sierra y valles guerrerenses. Las características del relieve son sierras de cumbres extendidas, laderas escarpadas, lomeríos con llanos aislados, valles de laderas tendidas con mesetas y mesetas con cañadas. La Cabecera Municipal, está rodeada de 9 elevaciones importantes las cuales se denominan: Tres Marías, Santa Cruz, La Malinche, Peña Colorada, La Víbora, Los Coyotes, Tepetzingo, Nixcongo y La Conchita, esta perteneciente a la cuenca del Río Balsas (Cortina Martínez, 2018).

## **Geología**

La geología representativa del municipio de Tenancingo, son rocas ígneas extrusivas como los basaltos y las tobas, las rocas sedimentarias: areniscas, conglomerados y calizas (Cortina Martínez, 2018).

## **Clima**

La localización de Tenancingo en la porción sur del valle de Toluca la hacen susceptible a mantener un clima estable, que en este caso es del tipo templado húmedo con lluvias en verano; según datos de la estación meteorológica de Coatepequito; se ha registrado una temperatura promedio de 19.6°C, en un período de 11 años (1979- 1998). Con base al período antes señalado se tiene que 1992 fue registrado como el año más frío con una temperatura promedio de 19.1°C, mientras que el año de 1998, se reconoció como el año más caluroso con una temperatura promedio de 21.4 °C. La precipitación pluvial registrada fue de 889.5 mm, siendo 1983 el año más seco, con una precipitación promedio de 639.3 mm, mientras que el año de 1991 como el más lluvioso con un promedio de 1,132.6 mm. Es de destacar que, entre los meses de junio a septiembre, se clasifica como la temporada de lluvias (Cortina

Martínez, 2018).

### **Hidrología**

La hidrología en Tenancingo es resultado de la Región Hidrológica “Río Balsas”, que corresponde a su vez a la Cuenca del Río Grande de Amacuzac, donde se ha conformado una especie de “Sistema” hidrológico, compuesto por el Río Tenancingo, que es el escurrimiento más importante del municipio y puede decirse que de la región, debido al itinerario que recorre cuyo origen es en los manantiales de San Pedro Zictepec (municipio de Tenango del Valle) y que llega al Estado de Guerrero hasta ser uno de los ramales del Río Balsas. Existen 37 cuerpos de agua, que se concentran en una superficie de 37 hectáreas; además 22 manantiales, 7 acueductos y 21 arroyos de corriente intermitente (Cortina Martínez, 2018).

### **Flora**

El municipio de Tenancingo se encuentra en una de zona de transición, donde predominan especies del neártico y del neotropical, la vegetación es muy variada de acuerdo a cada estrato arbóreo, entre éstos abundan el oyamel (*Abies religiosa*), encino (*Quercus rugosa*), pino (*Pinus montezumae*), cedro (*Cupressus lindleyi*), pirul (*Schinus molle*), madroño (*Arbutus unedo*), aile (*Alnus jorullensis*), trueno (*Ligustrum japonicum*), tepozán (*Buddleja cordata*), sauce llorón (*Salix babylonica*), nopal (*Opuntia microdasys*), manzanilla (*Chamaemelum nobile*), árnica (*Arnica montana*), ajenjo (*Artemisa absinthium*), yerbabuena (*Mentha spicata*), cedrón (*Lippia citriodora*), chilacayote (*Cucurbita ficifolia*), hierba del ángel (*Calliandra houstoniana*), ruda (*Ruta graveolens*), flor del saúco (*Sambucus nigra*), romero (*Rosmarinus officinalis*), albahaca (*Ocimum basilicum*) y ortiga (*California nettle*) entre otros (Cortina Martínez, 2018).

### **Fauna**

El municipio de Tenancingo se encuentra ubicado dentro de las sierras montañosas, lomeríos y la depresión del Balsas en la zona sur. La conjunción de estas regiones propicia la diversidad de especies, entre las cuales están: cacomiztle (*Bassariscus astutus*), ratón venado (*Peromyscus maniculatus*), ardilla gris (*Sciurus aureogaster*) liebre torda (*Lepus callotis*), tuza (*Thomomys umbrinus*), conejo mexicano (*Sylvilagus cunicularius*), armadillo (*Dasypus*

*novemcinctus*), murciélago mexicano (*Choeronycteris mexicana*), zorrillo (*Spilogale pygmaea*), tejón (*Taxidea taxus*), coyote (*Canis latrans*), chapulín (*Melanoplus differentialis*), abeja silvestre (*Apis mellifera*) entre otros (Cortina Martínez, 2018).



Figura 3. Estroma de *Cordyceps* sp.



Figura 4. Reactivación y obtención de la cepa pura de *Cordyceps* sp., en el medio PDA.

### 6.3 Medios de cultivo evaluados

El re-aislamiento de la cepa se llevó a cabo en seis diferentes medios de cultivo, (de cada medio se realizaron 5 réplicas, dando una N de 30), los cuales fueron: Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Extracto de Malta (EMA), Agar Sabourad (SB), Agar Arroz (AAr), Agar Trigo (AT), Agar Agua (AA), a una temperatura de 25 ° C en condiciones de oscuridad parcial (Kumar y Sagar, 2006).

**Tabla 12. Medios de cultivo empleados en el experimento**

Componente	Medios (g/L)					
	PDA	EMA	SB	AAr	AT	AA
Infusión de papa	4					
Dextrosa	20		40			
Agar	15	15	15	15	15	15
Medio de cultivo	39	33.6				
Sacarosa		12.75				
Dextrina		2.75				
Glicerol		2.35				
Peptona		0.78				
Peptona de caseína			5			
Harina de Arroz				17.5	17.5	

### 6.2.1 Modo de preparación

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15-20 min, posteriormente, se vertieron en cajas Petri de plástico de 90 mm de diámetro, con capacidad de 20 mL.

A cada caja Petri con medio de cultivo se le removió de su centro una alícuota de medio de 0.5 mm de diámetro y se reemplazó con una alícuota de medio con micelio extraído del borde de la colonia de *Cordyceps* sp. A partir de la alícuota miceliar, se dibujó al reverso de las cajas Petri dos ejes ortogonales como referencia para el registro de la medida de la colonia usando los dos ejes cardinales X, Y.



#### 6.4 Caracterización morfológica de la Cepa (C3) de *Cordyceps* sp.

##### Caracteres macroscópicos:

Se utilizó el microscopio estereoscópico para observar la forma, margen, textura, superficie de la colonia y el tipo de crecimiento que presentó el micelio, a los 38 días de incubación que fue cuando el micelio cubrió completamente el área de la caja de Petri (Mains, 1958; Kobayasi, 1941, 1982).

##### Caracteres microscópicos:

A los 38 días de incubación y con ayuda de un microscopio óptico (dicha medición se llevó a cabo con el objetivo 100x) y el software Motic (figura 6); se midió el diámetro de 20 esporas, de cada medio de cultivo, dando un total de 120 mediciones; también se midió el grosor y estructura de las hifas (Mains, 1958; Kobayasi, 1941, 1982).



Figura 6. Caracterización microscópica de *Cordyceps* sp., a 100x en el microscopio óptico con tinción de rojo Congo.

### **Velocidad de crecimiento:**

De acuerdo con Shrestha *et al.*, (2006) se hizo la medición del crecimiento miceliar de los diferentes tratamientos cada tercer día, con la ayuda de un Vernier. La medición se llevó a cabo midiendo el radio del micelio a partir del inóculo (5 mm es el diámetro del horador) colocado en la parte central de la caja de Petri.

### **Biomasa miceliar:**

A los 38 días de incubación y de acuerdo con el método de Shrestha (2006); se cuantificó la biomasa miceliar; el micelio junto con el medio de cultivo se extrajo de las cajas Petri y se colocaron en vasos de precipitados con agua caliente a 100°C para que el medio de cultivo se derritiera y así poder obtener solamente el micelio (figura 7). Posteriormente, se lavó tres veces con agua destilada (figura 8) para retirar el exceso de medio de cultivo. Por último, el micelio introdujo en el horno de secado a una temperatura de 60°C por 24 horas para eliminar por completo el exceso de agua y así mediante la diferencia de pesos, con la ayuda de una balanza analítica se obtuvo el peso seco de cada una de las repeticiones (Huerta *et al.*, 2009; Sung *et al.*, 2010).



Figura 7. Filtración de la biomasa de la C3 de *Cordyceps* sp.



Figura 8. Lavado con agua destilada de la biomasa de la C3 de *Cordyceps* sp.



Figura 9. Secado de la biomasa de la C3 de *Cordyceps* sp., en el horno de secado a una temperatura de 60°C por 24 horas

### 6.5 Diseño experimental y Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de biomasa y velocidad de crecimiento se sometieron a análisis estadísticos en el programa Statgraphics, Centurion XVIII. Se llevó a cabo un diseño experimental completamente aleatorio, la variable independiente fue el medio de cultivo (PDA, EMA, SB, AA, AAr y AT). Las variables dependientes fueron, velocidad de crecimiento y cantidad de biomasa.

Se hizo un ANOVA para conocer si hay o no hay diferencias estadísticas de las variables dependientes, de acuerdo a cada medio de cultivo utilizado; se aplicó una prueba Tukey. El tamaño de la muestra fue de 30, siendo 5 réplicas por cada medio de cultivo, con una P con 95% de confianza.

## 7. Resultados

### 7.1. Caracterización morfológica de *Cordyceps* sp. (Tabla 1)

#### **Coloración:**

La cepa 3 de *Cordyceps* sp., desarrollada en los seis medios de cultivo mostró en general tonalidades blancas y amarillas, de acuerdo con la clave de colores HTML codes (<http://html-color-codes.info>).

En el medio AA el color de la cepa fue blanco (#FFFFFF), en los medios PDA, AAr y AT blanco y ligeramente amarillo (#F5F6CE), en caso de EMA y SB ligeramente amarillo en la zona centro de la cepa (#F2F5A9).

#### **Tipo de micelio:**

El micelio de la C3 de *Cordyceps* sp., fue aéreo en todos los medios de cultivo utilizados.

#### **Forma de la colonia:**

En los medios AA y AT la forma fue irregular, en cambio, en los medios PDA, EMA, SB y AAr fue circular.

#### **Textura de la colonia:**

En el caso de AA no fue posible determinar la textura debido a la escasez del micelio; PDA presentó textura aterciopelada y SB, AAr, AT, EMA algodonosa.

#### **Margen de la colonia:**

AA presentó margen irregular, AT lobulado, tanto PDA como EMA, SB y AAr fimbriado.

#### **Superficie de la colonia:**

Tanto AA como AT presentaron superficie irregular, PDA convexa, SB plana, EMA y AAr cóncava. (Figura 10, tabla 1)

**Tabla 1.** Caracterización macroscópica de la C3 de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Forma de la colonia</b>	<b>Textura de la colonia</b>	<b>Margen de la colonia</b>	<b>Superficie de la colonia</b>	<b>Color</b>
<b>AA</b>	Irregular	-	Irregular	Irregular	Blanco
<b>AT</b>	Irregular	Algodonosa	Lobulado	Irregular	Blanco y amarillo
<b>PDA</b>	Circular	Aterciopelada	Fimbrado	Convexa	Blanco y amarillo
<b>EMA</b>	Circular	Algodonosa	Fimbrado	Cóncava	Ligeramente amarillo
<b>SB</b>	Circular	Algodonosa	Fimbrado	Plana	Ligeramente amarillo
<b>AAr</b>	Regular	Algodonosa	Fimbrado	Cóncava	Blanco y amarillo

\* - Ausencia. Medios de cultivo: Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Extracto de Malta (EMA), Agar Sabouraud (SB), Agar Arroz (AAr), Agar Trigo (AT), Agar Agua (AA).

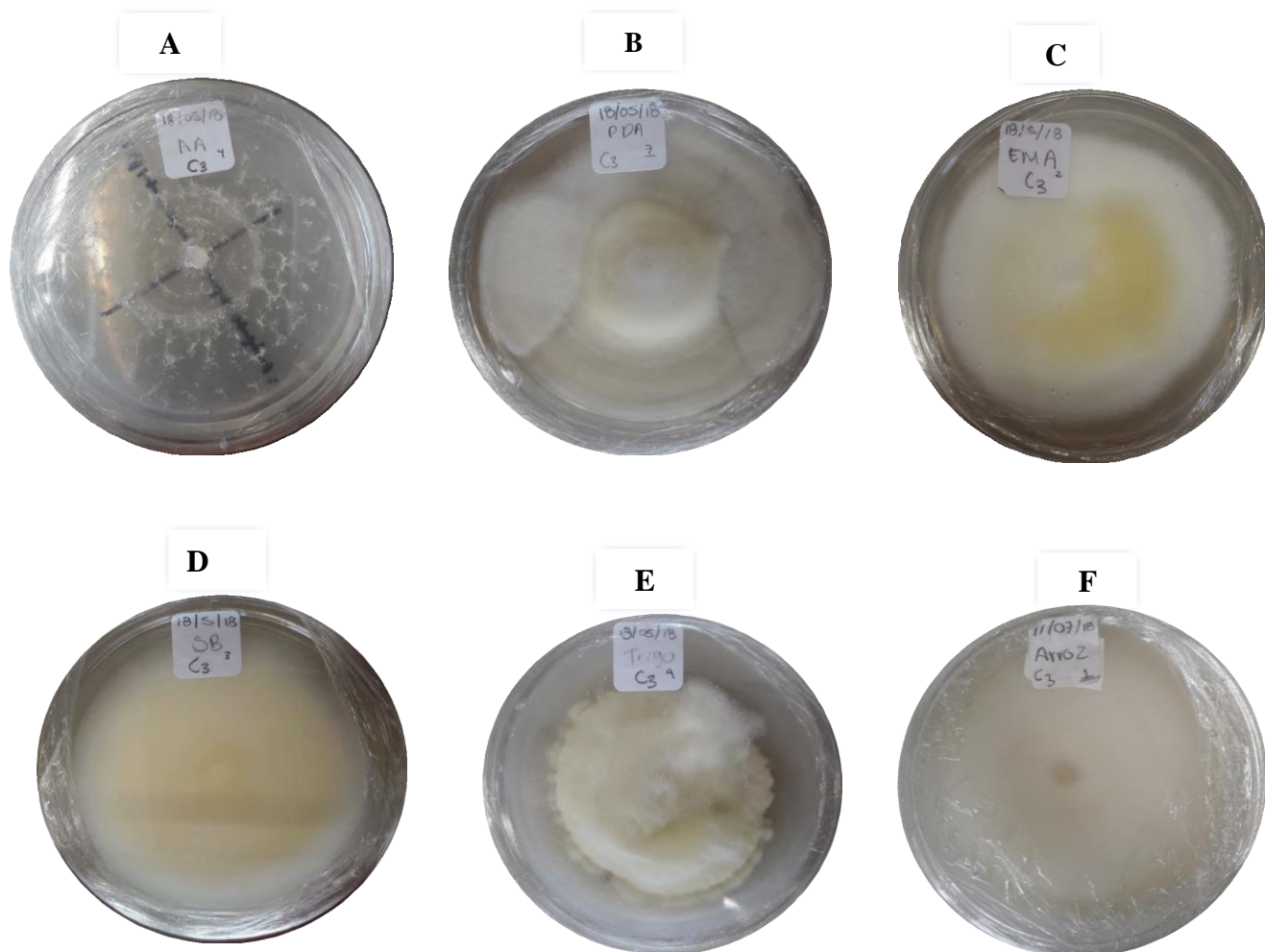


Figura 10. Coloración del micelio de la C3 de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo. (A) AA, (B) PDA, (C) EMA, (D) SB, (E) AT y (F) AAr.

## **7.2. Caracterización microscópica de *Cordyceps* sp. (Tabla 2)**

### **Tipo de hifas:**

Se identificaron hifas de tipo ramificadas en todos los medios de cultivo.

### **Presencia de septos:**

Se determinaron hifas septadas, independientemente del tipo de medio de cultivo empleado.

### **Terminación hifal:**

En los medios AA, AT, EMA, SB, AAr se encontraron terminaciones redondeadas, y en el medio PDA alantoideas y redondeadas.

### **Grosor de las hifas:**

En los medios AA, EMA, SB, AAr el grosor de las hifas estuvo dentro del rango de 1.0-1.4  $\mu\text{m}$ , mientras que en los medios AT y PDA fue de 2.0-2.5  $\mu\text{m}$ .

### **Tamaño de las esporas:**

En los medios EMA, PDA, AT, AA y AAr el valor osciló entre 3.58-3.20  $\mu\text{m}$ , sin embargo, en el medio SB fue donde se encontró un mayor tamaño, con un valor de 3.62  $\mu\text{m}$ . (Tabla 3).

**Tabla 2.** Caracterización microscópica de la cepa C3 en los diferentes medios de cultivo

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Tipo de hifa</b>	<b>Presencia de septos</b>	<b>Terminación hifal</b>	<b>Grosor de hifa <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Diámetro de esporas <math>\mu\text{m}</math></b>
<b>AA</b>	Ramificadas	*	Redondeada	1.7	3.20
<b>AT</b>	Ramificadas	*	Redondeada	2.12	3.27
<b>PDA</b>	Ramificadas	*	Alantoidea y redondeada	1.92	3.56
<b>EMA</b>	Ramificadas	*	Redondeada	2.06	3.58
<b>SB</b>	Ramificadas	*	Redondeada	2.79	3.62
<b>AAr</b>	Ramificadas	*	Redondeada	1.72	3.31

\* Presencia - Ausencia



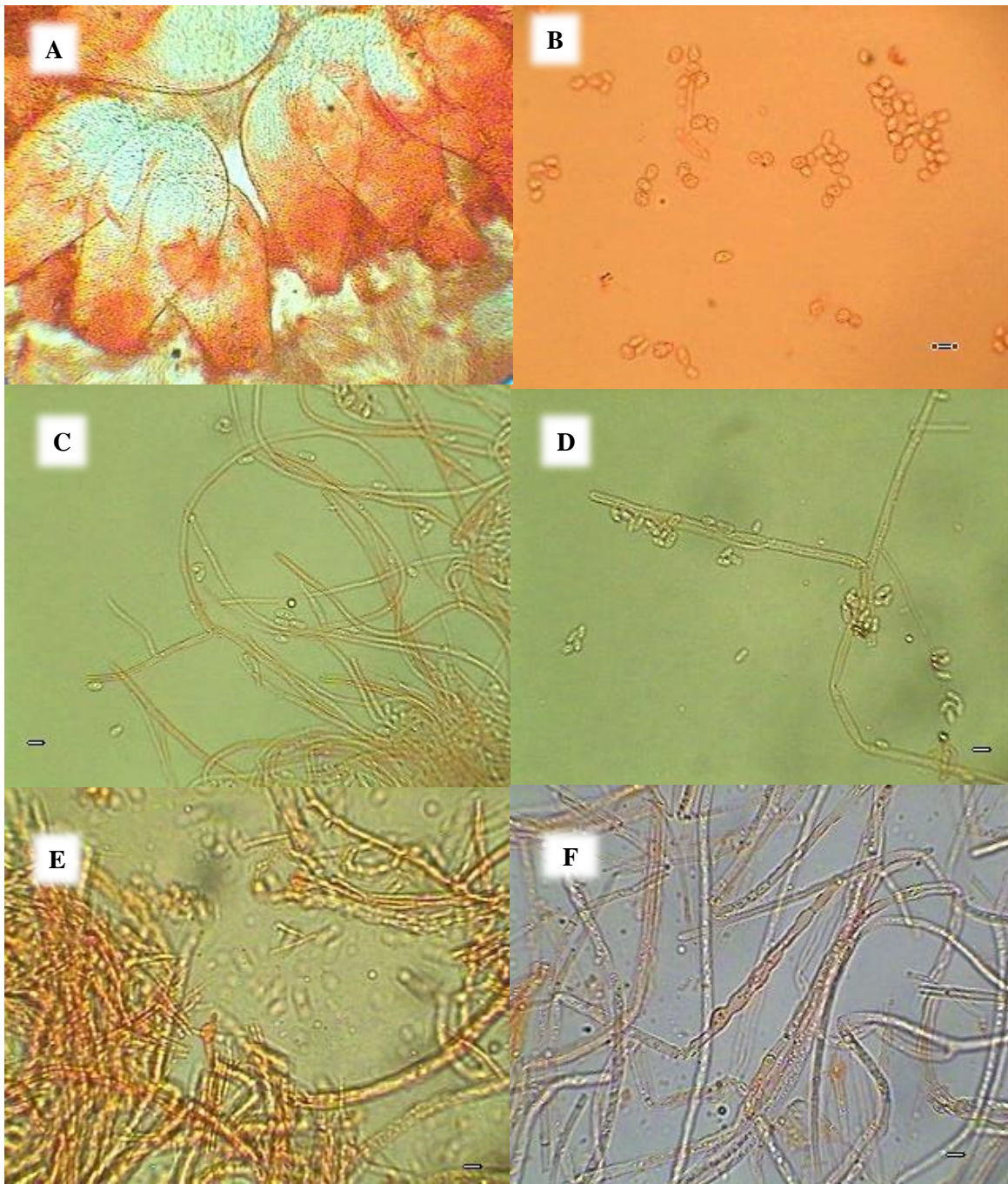


Figura 11. Caracterización microscópica de la cepa C3 de *Cordyceps* sp. (A) Peritecios. (B) Esporas, en AT. (C) Hifas con terminación redondeada, en SB. (D) Hifas y esporas en EMA. (E) Ascosporas, en PDA. (F) Hifas en AT. Observación 100x a excepción de (A) 40x. Tinción con rojo Congo. Escala de las barras= 5  $\mu$ m.

### 7.3. Análisis estadístico del diámetro de las esporas

**Tabla 3. Promedio del diámetro de las esporas de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo.**

	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )					
	SB	AT	EMA	PDA	Arr	AA
	3.1	2.5	3.5	3.9	2.5	2
	3.9	2	2.4	4.4	3.3	4.9
	3.3	2.4	2.9	4	3.9	3.5
	3.2	3.7	4.8	3.3	2	5.5
	3.3	3.1	3.6	3.4	5.4	5
	4.4	4.4	4	3.4	3.1	2.9
	3.1	3	4.3	4.6	3.9	4.4
	3.3	2.4	3.1	3.9	4.2	2.9
	3.1	2.4	2.9	3.9	3.3	4.8
	3.8	3.9	4.4	1.5	3.5	3
	3.3	3.3	3.4	2.4	5	2.9
	5.4	5.4	2.9	3.1	3	3.4
	3.7	3.7	2.4	1.6	3.4	3.5
	3.4	3.4	4.6	3.9	3.6	2.9
	5	5	4.3	3.1	2.4	1.9
	3.7	3.7	3.3	1.5	2.6	3
	3.6	1.9	3.9	2.6	1.5	3.4
	3.1	3.1	4.7	3.6	2.9	3.9
	2.8	2.8	3.1	3.5	3.4	3.6
	3.9	3.3	3.1	2.4	3.4	3.9
<b>Promedio</b>	3.62	3.27	3.58	3.2	3.315	3.565

## ANOVA

La ANOVA (Tabla 4) muestra un valor p de 0.4865, el cual es mayor a 0.05, esto indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la media de diámetro de esporas entre un nivel de medio de cultivo y otro, con un nivel del 95% de confianza.

**Tabla 4.** ANOVA del diámetro de las esporas de la cepa C3 de *Cordyceps* sp.

Fuente	Suma de Cuadrados	G. l.	Cuadrado Medio	Razó n-F	Valor-P
Entre grupos	3.368	5	0.6736	0.90	0.4865
Intra grupos	85.717	114	0.751904		
Total	89.085	119			

## Diagrama de caja y bigotes

La figura 12, compara el diámetro de las esporas en los diferentes medios de cultivo, percibiendo así, la mediana, la dispersión de los datos y su simetría.

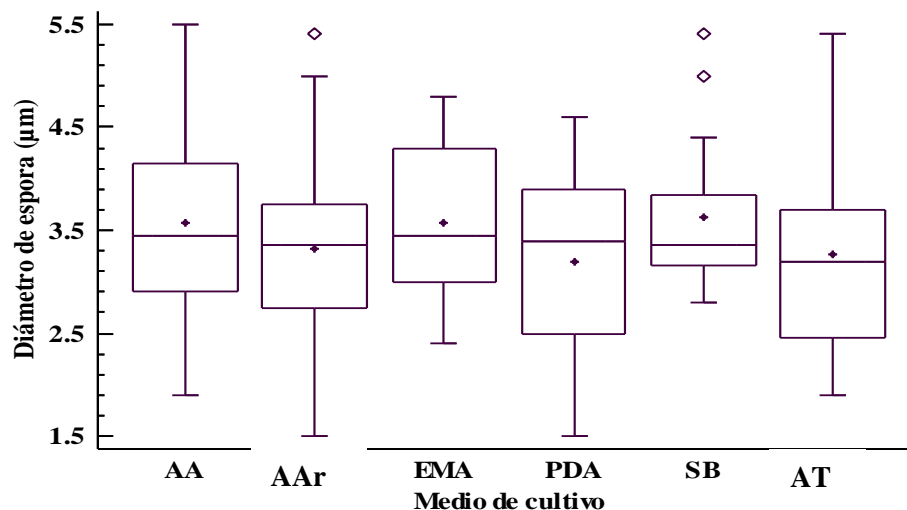


Figura 12. Diagrama de caja y bigotes del diámetro de las esporas de *Cordyceps* sp., respecto

a los diferentes medios de cultivo. \*AA, AAr, AT, EMA, PDA y SB.

#### 7.4. Análisis estadístico del grosor de las hifas

##### ANOVA

El ANOVA (Tabla 4), muestra un valor  $p = 0.0026$ , menor a  $.05$ , indicando una diferencia estadísticamente significativa entre la media del grosor de las hifas y el medio de cultivo, con un nivel del 95% de confianza.

**Tabla 5.** ANOVA del grosor de las hifas de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., respecto a los diferentes medios de cultivo.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16.1677	5	3.23353	3.91	0.0026
Intra grupos	94.391	11	0.827991		
Total (Corr.)	110.559	11			
		9			

### Prueba de Tukey

La prueba de Tukey (Tabla 5) indica que, en AA, AAr, PDA el grosor de las hifas es igual, en cambio, entre EMA y AT hay cierta similitud con AA, AAr, PDA; siendo el medio SB diferente a los demás y presentando un mayor grosor de las hifas.

**Tabla 6.** Prueba de Tukey, prueba de rangos múltiples del grosor de las hifas de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., por cada medio de cultivo.

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AA	20	1.7	A
AAr	20	1.72	A
PDA	20	1.92	A
EMA	20	2.065	A B
AT	20	2.12	A B
SB	20	2.795	C

## 7.5. Velocidad de crecimiento

Los valores de velocidad de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., cultivada bajo condiciones de obscuridad parcial son dados en la Tabla 6. La tasa de crecimiento radial (mm/día) de *Cordyceps* sp., fue influenciada por el medio utilizado y dicha tasa se obtuvo a los 38 días de incubación.

Después de aproximadamente 4 o 5 semanas de incubación bajo obscuridad parcial, el crecimiento radial de la colonia fue alto en el medio AAr con (0.195 mm/día) y el menor crecimiento se presentó en EMA (0.132 mm/día); el resto de los medios tuvo un crecimiento radial intermedio (0.176-0.170 mm/semana).

**Tabla 7.** Promedio de velocidad de crecimiento (mm/día) de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo.

Medio	Replica					Promedio
	1	2	3	4	5	
<b>SB</b>	0.17021277	0.15384615	0.17021277	0.17021277	0.15384615	0.16366612
<b>EMA</b>	0.13114754	0.13114754	0.13114754	0.13114754	0.13559322	0.13203668
<b>PDA</b>	0.17021277	0.17021277	0.17021277	0.18604651	0.18604651	0.17654626
<b>AT</b>	0.15384615	0.17021277	0.17021277	0.15384615	0.17021277	0.16366612
<b>AA</b>	0.17021277	0.17021277	0.17021277	0.17021277	0.17021277	0.17021277
<b>AAr</b>	0.18604651	0.2	0.21052632	0.21052632	0.17021277	0.19546238

La ANOVA (Tabla 7) presenta un valor de p de 0.0000, menor a 0.05, lo cual indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de velocidad de crecimiento y el medio de cultivo, con un nivel del 95% de confianza.

**Tabla 8.** ANOVA de la velocidad de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Entre grupos</b>	<b>0.010781</b>	5	0.0021562	23.96	0.0000
<b>Intra grupos</b>	<b>0.00216017</b>	24	0.0000900073		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>0.0129412</b>	29			

La prueba de múltiples rangos (Tabla 9) indica que AT, SB, AA, PDA estadísticamente no presentan diferencias, puesto que presentan valores bastante similares. En cambio, EMA muestra un valor de 0.132037 y AAr 0.195462, siendo estos diferentes a los cuatro anteriores.

**Tabla 9.** Prueba de rangos múltiples para la velocidad de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp.

<b>Nivel</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>EMA</b>	5	0.132037	A
<b>AT</b>	5	0.163666	B
<b>SB</b>	5	0.163666	B
<b>AA</b>	5	0.170213	B
<b>PDA</b>	5	0.176546	B
<b>AAr</b>	5	0.195462	C

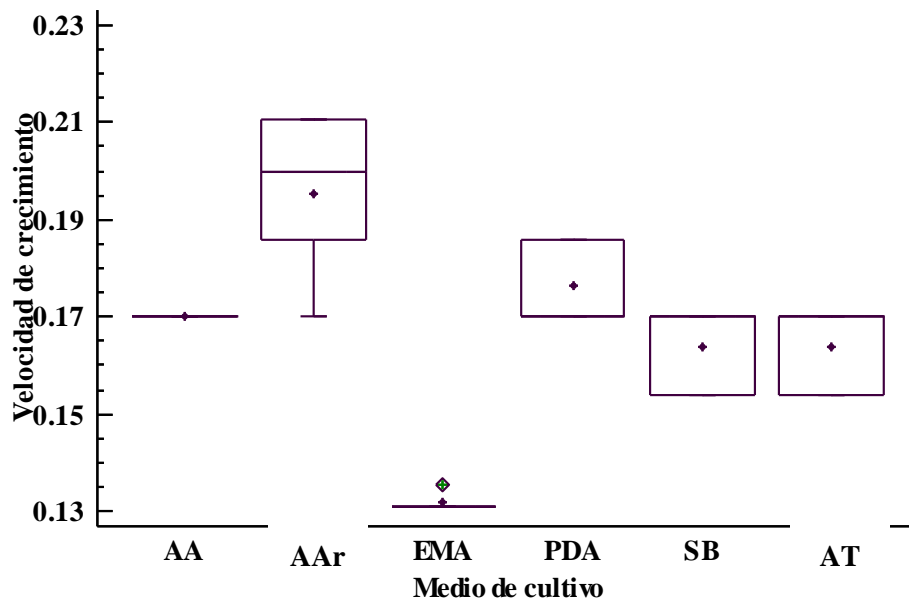


Figura 14. Diagrama de caja y bigotes de la velocidad de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., respecto a los diferentes medios de cultivo. \*AA, AAr, AT, EMA, PDA y SB.

### 7.6. Análisis estadísticos de biomasa

La Tabla 9 muestra el peso (g) de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo. La cepa presentó un mayor peso en el medio AT con un valor de 0.314 g y un menor peso en el medio AA, En los medios SB, EMA, PDA y AAr los valores oscilan entre 0.304 y 0.078.



**Tabla 10.** Peso (g) de la biomasa de la cepa C3 de *Cordyceps* sp. En los diferentes medios de cultivo.

Medio	Replica					Promedio
	1	2	3	4	5	
<b>SB</b>	0.37	0.33	0.22	0.3	0.3	0.304
<b>EMA</b>	0.08	0.07	0.11	0.08	0.05	0.078
<b>PDA</b>	0.07	0.23	0.24	0.07	0.09	0.14
<b>AT</b>	1.3	0.09	0.02	0.06	0.1	0.314
<b>AA</b>	0.03	0.01	0.01	0.01	0.06	0.024
<b>Aar</b>	0.21	0.01	0.07	0.09	0.15	0.106

La ANOVA (Tabla 10) indica un valor de  $p = 0.2745$ ,  $< 0.05$ , mostrando que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de biomasa total y el medio de cultivo, con un nivel del 95 % de confianza.

**Tabla 11.** ANOVA de la biomasa de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Entre grupos</b>	0.36491	5	0.072982	1.36	0.2745
<b>Intra grupos</b>	1.28896	24	0.0537067		
<b>Total (Corr.)</b>	1.65387	29			

La ANOVA (Tabla 10) arrojó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de biomasa y el medio de cultivo, esto pudo deberse a que los datos son atípicos y no presentan una distribución normal, por ello se llevó a cabo la prueba Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias.

La prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 11) muestra un valor  $p = 0.00403834$ ,  $< 0.05$ , e indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95% de confianza.

**Tabla 12.** Prueba de Kruskal-Wallis para biomasa total por medio de cultivo

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Tamaño Muestra</b>	<b>Rango Promedio</b>
<b>AA</b>	5	3.7
<b>EMA</b>	5	11.6
<b>PDA</b>	5	14.7
<b>SB</b>	5	21.6
<b>AT</b>	5	13.4

Estadístico = 15.344 Valor-P = 0.00403834

Por otro lado, para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras, se realizó un gráfico de caja y bigotes (Figura 6), haciendo énfasis en la muesca de las medianas. Las muescas permiten visualizar los intervalos de confianza alrededor de las medianas. En la Figura 6 las cruces rojas corresponden a las medias, las barras horizontales son las medianas. Los límites marcados por las muescas representan intervalos de confianza alrededor de las medianas. Puesto que las áreas con muescas no se superponen significativamente a través de los gráficos de caja, se puede interpretar que las cinco medianas son diferentes entre sí.

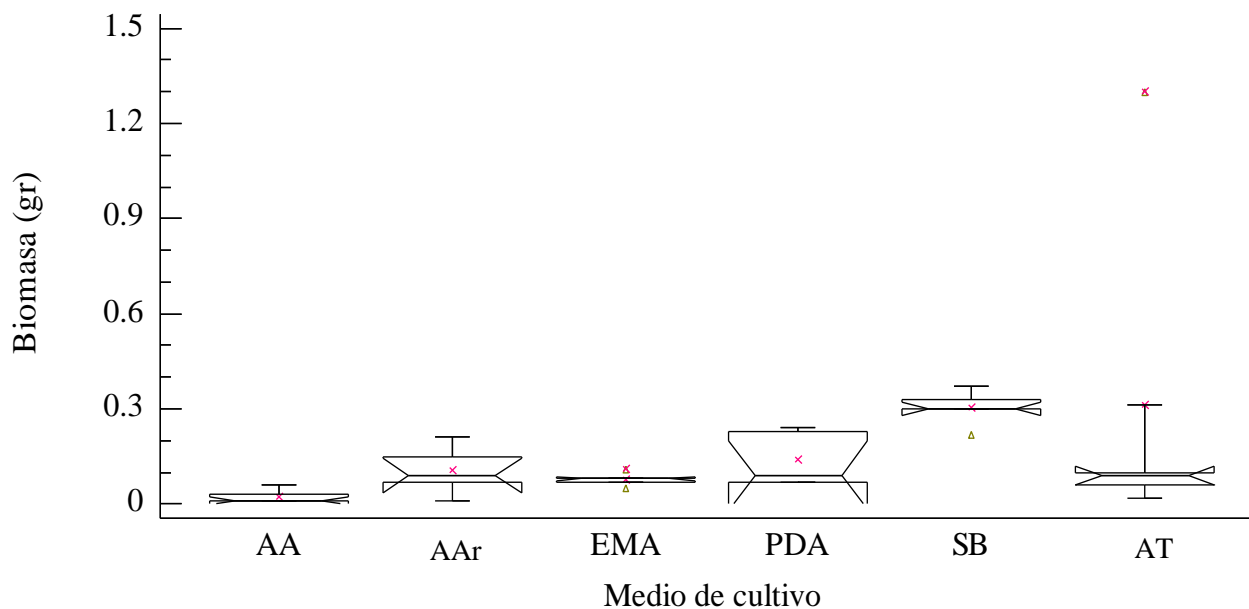


Figura 15. Diagrama de caja y bigotes: con muescas, de la biomasa de cepa C3 de *Cordyceps* sp., respecto a los diferentes medios de cultivo. \*AA, AAr, AT, EMA, PDA y SB.

### 7.7. Cinética de crecimiento de *Cordyceps* sp.

En la figura 16, se muestran las tres etapas de crecimiento de *Cordyceps* sp. De los días 0-5 se muestra la fase de iniciación, de los días 6 al 23 la fase de crecimiento y aproximadamente a partir del día 25 la fase de latencia, en la cual la cepa dejó de crecer.

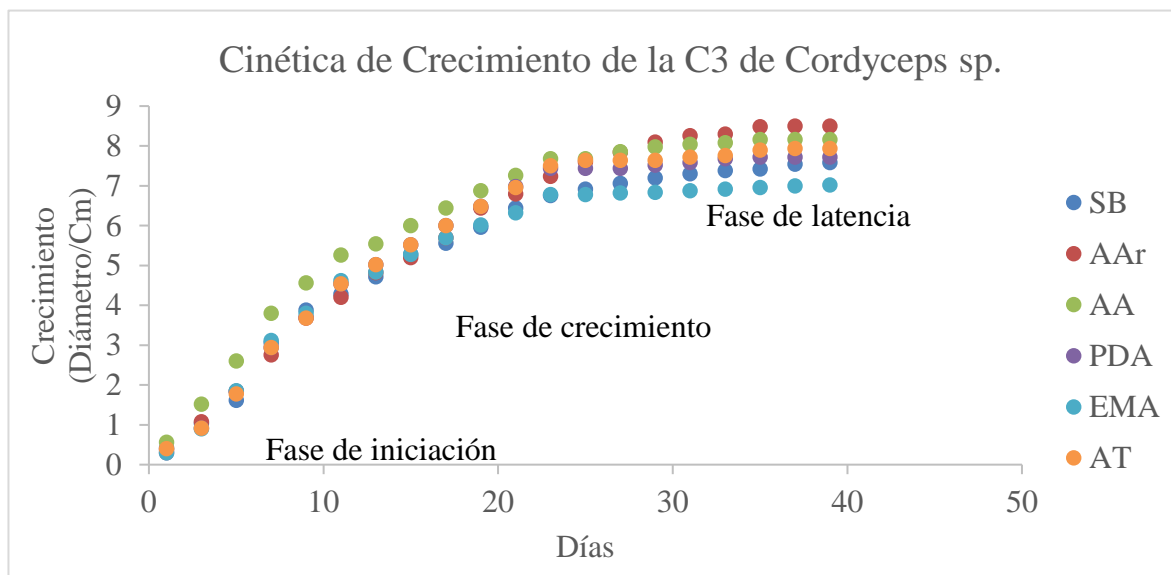


Figura 16. Cinética de crecimiento de la cepa C3 de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo. A) AT, B) SB, C), AA D), EMA E) AAr y F) PDA.

## 8. Discusión

### Caracterización del estroma

En 2019 López-Rodríguez realizó la caracterización del ejemplar de *Cordyceps* sp., el cual presentó un estado sexual: estromas clavados y cilíndricos (longitud 20-102 mm, n=50) algunas ocasiones con una hendidura vertical en medio del estroma o bifurcados en la parte apical, solitario o gregarios, carnosos; estípite alargado (5-85 mm, n=50) amarillo brillante (#FFFF00, #F3F781). Se observan cordones miceliares blanquecinos del estroma al hospedero. Contexto compacto o cavernoso, peritecios ovoides y sub ovoides (196-1600 micras x 97-508 micras, n=152) completamente inmersos en el estroma. Ascas con maduración asincrónica, de forma cilíndrica (longitud: 223-805  $\mu\text{m}$ , n= 20; ancho 2.3-7.4 micras, n= 178). Con tapa apical bifurcada subglobosa (diámetro: 3-5  $\mu\text{m}$ , n=20). Las ascas maduras contienen ascosporas filiformes mutiseptadas (ancho: 0.4-1.5  $\mu\text{m}$ , n=100) que se desarticulan en partes de esporas de forma rectangular (2.1-8.1  $\mu\text{m}$  x 0.5-1.5  $\mu\text{m}$ , n= 134), en las ascas inmaduras no se observan las ascosporas y su morfología es similar a artrosporas, porque se separan, pero no se forman completamente septos. En algunos ejemplares los peritecios contienen estructuras fúngicas fusiformes irregulares (7.7-38.3  $\mu\text{m}$  x 2.1-9.4, n= 77).

Los resultados de este estudio muestran que tanto la oscuridad parcial como la composición de los medios de cultivo sólidos pueden tener una incidencia en el crecimiento micelial de *Cordyceps* sp. Estos resultados corroboran las observaciones realizadas para *Cordyceps fumosorosea* (Shim *et al.*, 2003), *C. militaris* (Shrestha *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2012, 2013), *C. cardinalis* (Sung *et al.*, 2010), *C. pruinosa* (Oh *et al.*, 2014) y *C. nidus* (Chirivi *et al.* 2017).

## **Aspectos generales de los medios de cultivo**

Los medios de cultivo sólidos fueron utilizados para evaluar las diferentes características de crecimiento de *Cordyceps* sp. y permitieron observar las variaciones por las que pasó la cepa en los diferentes períodos de tiempo durante su incubación. Los medios de cultivo sólidos son más adecuados que los líquidos para estudiar las distintas características y fases de crecimiento de hongos como *Cordyceps* (*s. l.*), puesto que en su hábitat natural se encuentran en el suelo (Shrestha *et al.*, 2006).

## **Caracterización macroscópica**

### **Densidad miceliar**

En cuanto a la densidad del micelio, en los medios EMA, PDA, SB, AAr, AT esta fue abundante, sin embargo, en AA fue escasa, esto concuerda con lo mencionado por López (2017) que, en condiciones de oscuridad, las dos cepas con las que trabajó presentaron una menor densidad en AA, moderado en PDA y EMA, y abundante en PDA+Y y SB.

*Cordyceps* sp. se desarrolla en un amplio rango de medios de cultivo, incluyendo medios nutricionalmente pobres (Shrestha *et al.*, 2006) como lo es AA, sugiriendo que este es un hongo fagotrófico facultativo en cuestiones de hábitos nutricionales. Esta característica le podría permitir al hongo su desarrollo en otros hospederos, y aún sobre sustratos diferentes al de los insectos pudiendo conservarse en su hábitat natural cuando la población de estos es reducida.

Kamata (2000), Hesketh *et al.*, (2010) y Boomsma *et al.*, (2014) observaron que algunos hongos entomopatógenos pueden sobrevivir en el suelo, en plantas o en los troncos de los árboles con un crecimiento miceliar limitado por largos períodos de tiempo sin parasitar a sus hospederos. Estos hongos también pueden existir como endófitos en un rango amplio de especies de plantas entrando a través de las hojas, tallos, semillas, y raíces; permaneciendo ahí o moviéndose dentro de la planta de una manera saprófita por mucho tiempo. Del mismo

modo, algunas especies anamorfas de *Cordyceps* como *Metarhizium* son casi exclusivamente encontradas en las raíces, mientras que *Beauveria bassiana* es encontrada en toda la planta (Behie *et al.*, 2015), y muchos otros hongos entomopatógenos actúan del mismo modo incluyendo a *Cordyceps sisariformes* (Vega *et al.*, 2009).

### **Coloración de la cepa 3 de *Cordyceps* sp**

En condiciones de oscuridad parcial, en el medio AA, la cepa C3 presentó una coloración blanca, en cambio, en los medios AT, PDA, EMA, SB y AAr la pigmentación fue blanca ligeramente amarilla. Se sabe que el micelio de *Cordyceps* produce mayor pigmentación cuando es expuesto a la luz visible directamente. *Cordyceps militaris* es un hongo entomopatógeno amarillo y anaranjado cuando crece con luz blanca, pero incoloro en oscuridad (Shrestha *et al.*, 2005, 2006). Un efecto metabólico de la luz blanca en los hongos es la inducción a la síntesis de carotenoides, que son las moléculas principalmente causantes de la pigmentación amarilla, anaranjada y roja de los hongos, que sirven de defensa del daño que pudiera ocasionar las radiaciones, y su acumulación es debido a los largos periodos de exposición produciéndose mayor coloración y protección (Carlile *et al.*, 2001; Shrestha *et al.*, 2005, 2006). A pesar de ello, hongos como el ascomiceto *Monascus purpureus* podrían contener pigmentos aun creciendo en oscuridad, pero en cantidades menores (Babitha *et al.*, 2008).

Otro factor muy importante que influye en la pigmentación de los hongos incluye a los elementos nutricionales que pueda contener el medio (Cho *et al.*, 2002). De los medios de cultivo evaluados en la condición de oscuridad parcial, los que contienen peptonas como SB y dextrosa como PDA, favorecieron la producción de pigmentos ligeramente amarillos en *Cordyceps* sp., debido a que la exposición de luz incidió poco tiempo sobre ello. Las peptonas son polipéptidos formados durante la degradación enzimática de proteínas, son la principal fuente de nitrógeno en un medio orgánico para el cultivo de microorganismos, contienen aminoácidos libres y cadenas cortas de péptidos, y a veces carbohidratos usados como fuentes de nitrógeno orgánico, además de que proporcionan otros nutrientes, principalmente aminoácidos y péptidos, que incrementan considerablemente la producción de pigmentos en muchas especies de hongos (Cho *et al.*, 2002; Shrestha *et al.*, 2006; da Costa *et al.*, 2016;



Chirivi *et al.*, 2017).

Otro caso es el de *Beauveria bassiana*, en sus colonias no se observaron diferencias en cuanto a la pigmentación, cuando las colonias fueron cultivadas en medios adicionados con levadura en condiciones de luz y oscuridad constantes, produciendo colonias amarillas con centros blancos (Hyun *et al.*, 2013).

Por otro lado, en los medios de cultivo convencionales se emplean varios agentes selectivos dentro de los que se encuentran el azida de sodio, cloruro de sodio, antibióticos como gentamicina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico, entre otros, propiciando un mejor aislamiento de los microorganismos (Díaz Pérez *et al.*, 2013). Ahora bien, medios de cultivo no convencionales como como AAr y AT que no fueron suplementados con extracto de levadura y peptona, también produjeron pigmentación en la cepa C3 de *Cordyceps* sp. Pradeep y Pradeep, (2013) y da Costa *et al.*, (2016) mencionan que el extracto de malta y el extracto de papa, son fuentes enriquecidas de carbonos simples, así como fuentes de vitaminas y coenzimas que pueden promover el crecimiento y también la producción de pigmentos en hongos filamentosos. De ahí, que la dextrosa y la peptona como fuente directa de carbono en PDA, EMA y SB pudo haber contribuido para el desarrollo de la ligera pigmentación en condiciones de oscuridad parcial.

Sin embargo, otras especies de hongos aprovechan de modo distinto las fuentes de carbono, tal es el caso de *Isaria sinclairii* que fue evaluada para producir pigmentos rojos en medios con diferentes fuentes de carbono incubadas bajo oscuridad, el extracto de malta fue el que produjo menos y la sacarosa tuvo una producción media (Cho *et al.*, 2002), de ahí, que el sustrato y el metabolismo para la síntesis de pigmentos es específico de cada especie.

Otro ejemplo es el de *Monascus purpureus*, que produce pigmentos de diferentes tonalidades dependiendo de la composición del medio (Mukherjee y Singh, 2011). Igualmente, varias especies de *Cordyceps* favorecen su pigmentación de acuerdo con los medios y condiciones de cultivo (Shrestha *et al.*, 2006 y Oh *et al.*, 2014).

### **Morfología de la cepa**

La tabla 1 indica la caracterización macroscópica de la C3 de *Cordyceps* sp., en los diferentes medios de cultivo. En los medios PDA, EMA, SB se presentó una forma circular, sin embargo, en los medios no convencionales como lo son AA, AT y AAr la forma fue irregular.

En el medio PDA la textura fue aterciopelada y en los demás medios la textura fue algodonosa. En EMA, PDA y SB el margen fue fimbriado, AT lobulado y AA irregular. En todos los medios la superficie del micelio fue aéreo, Arana-Gabriel *et al.*, 2014 menciona que esto puede deberse a que el micelio aéreo favorece el proceso respiratorio al incrementarse la difusión del oxígeno y, por lo tanto, se genera la energía necesaria para mantener el metabolismo celular.

## **Caracterización microscópica**

### **Tamaño de las esporas**

La ANOVA (Tabla 3) mostró un valor  $p = 0.4865$ , esto indica que no existen diferencias estadísticamente significativas de la media del diámetro de esporas entre un nivel de medio de cultivo y otro. Sin embargo, pese a que el tamaño de las esporas es distinto y no se debe precisamente al medio de cultivo, Ramos y Meza (2017) mencionan que las esporas de los hongos son ligeramente higroscópicas (capacidad de algunas sustancias de absorber humedad del medio circundante), así mismo, Pasanen *et al.*, (1991), encontró que la concentración de esporas es más alta cuando la humedad del medio es más baja y obteniendo un crecimiento mínimo cuando la humedad relativa es mayor al 70 %, y que el tamaño de las esporas está determinado por la humedad del medio, cuanto más humedad existe, el tamaño de la espora es más mayor.

### **Grosor de las hifas**

La ANOVA (Tabla 4), muestra un valor  $p = 0.0026$ , indicando una diferencia estadísticamente significativa entre la media del grosor de las hifas y el medio de cultivo. Sin embargo, la prueba de Tukey (Tabla 5) indica que, en AA, AAr, PDA el grosor de las hifas es igual, en cambio, en EMA y AT hay cierta similitud con los medios ya mencionados; en cambio, el medio SB es diferente a los demás gracias a los altos niveles de C/N. Osorio

(2018) afirma que la especie que analizó pertenece a *Cordyceps* (*s.s*) y que las hifas tendieron a ser hialinas, lisas y con un grosor de  $1 \pm 0,3$  (0,6–2,0)  $\mu\text{m}$ , del mismo modo, la cepa C3 presentó hifas hialinas y lisas con un grosor que osciló entre 1 y 2.5  $\mu\text{m}$ .

### **Porcentaje de Biomasa**

La (Tabla 9) muestra el peso (g) de la cepa C3 al final de la semana 5-6 de incubación, en los diferentes medios de cultivo. En condiciones de oscuridad parcial la cepa C3 presentó una mayor biomasa en el medio AT con un valor de 0.314 g y un menor peso en el medio AA con un gramaje de 0.024. En cambio, en los medios SB, EMA, PDA y AAr los valores oscilan entre 0.304 y 0.078 (g), siendo estos menores.

Osorio (2018) da a conocer que en el medio Agar Malta se obtuvo una densidad abundante y textura algodonosa del micelio de *Cordyceps* sp., a partir de la primera semana de incubación en condiciones de oscuridad total, y seguido de ese medio, estuvo el Agar Malta Dextrosa Peptona, ambos medios son de uso general.

Las diferencias encontradas entre la densidad y textura miceliar en medios que contienen extracto de malta con los otros medios, estarían asociadas a la composición química de los mismos.

### **Velocidad de crecimiento**

En la (Tabla 6), se muestra que la tasa de crecimiento radial (mm/día) de *Cordyceps* sp., fue influenciada por el medio utilizado. Después de aproximadamente 5-6 semanas de incubación bajo oscuridad parcial, el crecimiento radial de la colonia fue alto en el medio AAr con (0.195 mm/día) y AA (0.189 mm/día), el menor crecimiento se presentó en EMA (0.132 mm/día). El resto de los medios tuvo un crecimiento radial intermedio (0.176-0.170 mm/semana). Osorio (2018) expresa que un medio pobre contiene menos nutrientes y el crecimiento va en una dirección radial generalmente rápido en búsqueda de los nutrientes. Por lo tanto, los medios pobres en nutrientes no pueden sostener una densidad miceliar abundante, pero si diámetros amplios (Shrestha *et al.*, 2006). Sin embargo, el crecimiento

miceliar de *Cordyceps* sp., no sólo se ve favorecido por la variedad y cantidad de carbono en los medios, sino también por el contenido de nitrógeno. Medios que en su composición contienen peptona y nitrógeno como lo es SB logran crecimientos miceliares satisfactorios en la mayoría de las colonias.

Sung *et al.*, (2010) demostró que el mejor medio para el crecimiento miceliar de *Cordyceps cardinales* estaba compuesto por 1% de maltosa, 2% de avena, 1% de peptona y 2% de agar, obteniendo densidad abundante y mayor crecimiento diametral de las colonias. De igual manera, Shrestha *et al.*, (2006) demostró que Agar Dextrosa Sabouraud Levadura y Agar Czapek-Dox Levadura son medios completos para el crecimiento de *C. militaris*. Las fuentes de carbono y nitrógeno son muy importantes para el crecimiento miceliar de los hongos entomopatógenos debido a su desarrollo natural sobre los hospederos (Shrestha *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2010). La importancia del carbono radica en que cerca de la mitad del peso seco de las células fúngicas contiene este elemento por ser estructural en su morfología, y por eso tiene un efecto directo sobre la producción de biomasa y el nitrógeno contribuye a su asimilación y metabolismo. El crecimiento miceliar de la cepa C3 fue distinto en cada medio de cultivo. Las diferencias fueron constantes entre los medios semana tras semana, aunque hubo días en los que la cepa dejó de crecer.

## **Conclusión**

Este estudio permitió identificar requerimientos nutricionales en *Cordyceps* sp., a partir de sus cultivos sólidos; encontrando datos significativos en medios adicionados con C/N.

Para la densidad del micelio, en los medios EMA, PDA, SB, AAr, AT esta fue abundante. Por consiguiente, en el medio AA, se presentó una coloración blanca, en cambio, en los medios AT, PDA, EMA, SB y AAr la pigmentación fue blanca ligeramente amarilla.

A cerca del diámetro de las esporas, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de estas.

En cuanto a velocidad de crecimiento, en el medio AAr fue donde se presentó un valor mayor, el cual fue de (0.195 mm/día), mientras que la menor velocidad de crecimiento se encontró en el medio EMA con un valor de (0.132 mm/día).

Por otro parte, en cuanto al porcentaje de biomasa, en el medio AT se presentó el valor mayor con (0.314 g) y un menor valor en el medio AA con un gramaje de (0.024).

Finalmente, con los datos obtenidos se puede dar pauta a futuras investigaciones relacionadas con el cultivo *in vitro* de *Cordyceps* sp., o de otras especies de hongos.

## 9. Referencias

- Alcántara, M. R. 2010. La importancia de los hongos. Revista Ecologista. 66. Consultado (octubre 2020) <https://www.ecologistasenaccion.org/19972/la-importancia-de-los-hongos/>
- Babitha, S., Carvahlo, J. C., Soccol, C. R., & Pandey, A. 2008. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24(11), 2671-2675.
- Basith, M., & Madelin, M. F. 1968. Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. Canadian Journal of Botany. 46(4), 473-480.
- Behie, S. W., Jones, S. J., & Bidochka, M. J. 2015. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. Fungal Ecology. 13, 112-119.
- Boomsma, J. J., Jensen, A. B., Meyling, N. V., & Eilenberg, J. 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. Annual Review of Entomology. 59, 467-485.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P. & Powell, I. B. 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. International Journal of Food Microbiology. 154(3), 87-97.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. 2001. The Fungi. Gulf Professional Publishing.
- Cepero de García, M. C. 2012. Biología de hongos. Ediciones Uniandes. Universidad de los Andes.
- Chirivi, J., Danies, G., Sierra, R., Schauer, N., Trenkamp, S., Restrepo, S., & Sanjuan, T. 2017. Metabolomic profile and nucleoside composition of *Cordyceps nidus* sp. nov.(Cordycipitaceae): A new source of active compounds. PloS one. 12(6), e0179428.
- Cho, Y. J., Park, J. P., Hwang, H. J., Kim, S. W., Choi, J. W., & Yun, J. W. 2002. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. Letters in applied microbiology. 35(3), 195-202.
- Cortina Martínez, A. 2018. Proyecto de ecoturismo en el parque nacional desierto del Carmen, Tenancingo, Estado de México.
- Cuevas-Moreno, J. A. 2016. Los hongos: héroes y villanos de la prosperidad humana. Revista Digital Universitaria. UNAM. 17(9), 1607-1609.
- da Costa Souza, P. N., Grigoletto, T. L. B., de Moraes, L. A. B., Abreu, L. M., Guimarães, L. H. S., Santos, C. & Cardoso, P. G. 2016. Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. Microbiology. 162(1), 12-22.

- García, A. Á., & Carril, E. P. U. 2011. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- Guzmán, G., Morón M. A., Ramírez-Guillén, F. & Wolf, J. H. D. 2001. Entomogenous *Cordyceps* and related genera from Mexico with discussions on their hosts and new records. *Mycotaxon*. 78,115-125.
- Hajek, A. E. & Delalibera, I. 2010. Hongos patógenos como agentes clásicos de control biológico contra artrópodos. *BioControl*. 55 (1), 147-158.
- Heim, R., & Wasson, R. G. 1958. Les champignons hallucinogènes du Mexique-Etudes ethnologiques, taxinomiques, biologiques, physiologiques et chimiques. *Archives du Muséum national d'Histoire naturelle, 7ème série*, 6, 1-445.
- Hesketh, H., Roy, H. E., Eilenberg, J., Pell, J. K., & Hails, R. S. 2010. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *BioControl*. 55(1), 55-73.
- Hong, I. P., Nam, S. H., Sung, G. B., Chung, I. M., Hur, H., Lee, M. W. & Guo, S. X. 2007. Chemical components of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) samson. *Mycobiology*, 35(4), 215-218.
- Huerta, G., Martínez-Carrera, D., Sánchez, J. E. & Leal-Lara, H. 2009. Grupos de interesterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Revista Mexicana de Micología*. 30, 31-42.
- Hyun, S. H., Lee, S. Y., Park, S. J., Kim, D. Y., Chun, Y. J., Sung, G. H. & Choi, H. K. 2013. Alteration of media composition and light conditions change morphology, metabolic profile, and beauvericin biosynthesis in *Cordyceps bassiana* mycelium. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(1), 47-55.
- Index Fungorum. 2020. Authors of fungal names [consultado 6 oct 2020]. Disponible en: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>
- Jaronski, S. T. 2014. Producción masiva de hongos entomopatógenos: estado del arte. En *Producción masiva de organismos benéficos*. 357-413.
- Kamata, N. 2000. Population dynamics of the beech caterpillar, *Syntypistis punctatella*, and biotic and abiotic factors. *Population Ecology*. 42(3), 267-278.
- Kobayasi, Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Science reports of the Tokyo Daigaku*. 84, 53-260.
- Kobayasi, Y. 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Transaction of the Mycological Society of Japan*.

- Kumar, A. & Sagar, A. 2006. *In vitro* isolation and influence of nutritional conditions on the mycelial growth of entomopathogenic and medicinal fungus *Cordyceps militaris*. Plant Pathology Journal. 5, 315-321.
- Li, S. P., Yang, F. Q., & Tsim, K. W. 2006. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41(5), 1571-1584.
- Lo, H. C., Hsieh, C., Lin, F. Y., & Hsu, T. H. 2013. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in Dong Chong Xia Cao and related bioactive ingredients. Journal of Traditional and Complementary Medicine. 3(1), 16-32.
- López, L. 2017. Aislamiento de cepas y obtención de metabolitos secundarios del Género entomopatógeno *Cordyceps sensu lato* del Estado de México (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de México, México.
- Mains E, B. 1958. North American Entomogenous species of *Cordyceps*. Mycologia. 23(50), 169-222.
- Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. N. 2014. Producción biotecnológica de carotenoides por levaduras: una visión general. Fábricas de células microbianas. 13(1), 12.
- Meylling, N. V., & Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. 45, 45-155.
- Mizuno, T. 1999. Medicinal effects and utilization of *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes) and *Isaria* Fr. (mitosporic fungi) Chinese caterpillar fungi," Tochukaso". International Journal of Medicinal Mushrooms. 1(3).
- Mukherjee, G., & Singh, S. K. (2011). Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. Process Biochemistry, 46(1), 188-192.
- Oh, T. J., Hyun, S. H., Lee, S. G., Chun, Y. J., Sung, G. H., & Choi, H. K. 2014. NMR and GC-MS based metabolic profiling and free-radical scavenging activities of *Cordyceps pruinosa* mycelia cultivated under different media and light conditions. PLoS One, 9(3), e90823.
- Osorio Posada, J. A. 2018. Caracterización morfológica de *Cordyceps* sp. (Ascomycota: Hypocreales) aislado de una pupa de mariposa (Insecta: Lepidoptera) del mariposario Amaranta de Colombia, Pereira, Risaralda. Tesis de Licenciatura.



- Pasanen, A. L., Pasanen, P., Jantunen, M. J., & Kalliokoski, P. 1991. Significance of air humidity and air velocity for fungal spore release into the air. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics.* 25(2), 459-462.
- Pérez, M. D., Martínez, C. R., & Zhurbenko, R. 2013. Enterococcus, conventional and chromogenic culture media. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología.* 51(1), 97-110.
- Pérez-Silva, E. 1977. Algunas especies del género *Cordyceps* (Pyrenomycetes) en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología.* 11, 145-153.
- Pérez-Silva, E. 1978. Nuevos registros del género *Cordyceps* (Pyrenomycetes) en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología.* 12, 19-25.
- Pérez-Villamares, J. C., Burrola-Aguilar, C., Aguilar-Miguel, X., Sanjuan-Guiraldo, T., & Jiménez-Sánchez, E. 2017. Nuevos registros de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps s. l.* (Ascomycota: Hypocreales) del Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 88(4), 773-783.
- Pradeep, F. S., & Pradeep, B. V. 2013. Optimization of pigment and biomass production from *Fusarium moniliforme* under submerged fermentation conditions. 10 (11).
- Quandt, C., Kepler, R., Gams, W., Araújo, J., Ban, S., Evans, H., Hughes, D., Humber, R., Hywel-Jones, N., Li, Z., Luangsa-ard, J., Rehner, S., Sanjuan, T., Sato, H., Shrestha, B., Sung, H., Yao, Y., Zare, R. & Spatafora, J. 2014. Phylogenetic-based nomenclatural proposals for Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) with new combinations in *Tolypocladium*. *Ima Fungus.* 5(1), 121-134.
- Ramos, R., & Meza, V. 2017. Efectos de algunos factores meteorológicos sobre la concentración de esporas de hongos en la Plaza San Martín de Lima. *Ecología aplicada.* 16(2), 143-149.
- Rubio-Bustos, S. Y., Guzmán-Dávalos, L. & Navarrete-Heredia, J. L. 1999. Especies entomopatógenas de *Cordyceps* (Fungi, Ascomycotina) en México. *Boletín del Instituto de Botánica. Universidad de Guadalajara.* 7, 135-157.
- Samson, R. A., Evans, H. C. & Latge, J. P. 1988. *Atlas of entomopathogenic fungi.* Springer Heidelberg. Berlin.
- Shah, P. A. y Pell, J. K. 2003. Hongos entomopatógenos como agentes de control biológico. *Microbiología y biotecnología aplicadas.* 61 (5), 413-423.
- Shashidhara, M., Giridharc, P., Udaya, K. & Manohara, B. 2013. Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement – A review. *EL SEVIER.* 30, 1-18.

- Shih, L., Tsai, K. L., & Hsieh, C. 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Engineering Journal*. 33(3), 193-201.
- Shrestha, B., Choi, S. K., Kim, H. K., Kim, T. W. & Sung, J. M. 2006. Observations on some of the mycelial growth and pigmentate on characteristics of *Cordyceps militaris* isolates. *Mycobiology*. 34, 83- 91.
- Shrestha, B., Choi, S. K., Kim, H. K., Kim, T. W., & Sung, J. M. 2005. Genetic analysis of pigmentation in *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*. 33(3), 125-130.
- Shrestha, B., Tanaka, E., Hyun, M. W., Han, J. G., Kim, C. S., Jo, J. & Sung, G. H. 2016. Coleopteran and lepidopteran hosts of the entomopathogenic genus *Cordyceps sensu lato*. *Journal of Mycology*.
- Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-ard, J. J., Shrestha, B., & Spatafora, J. W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*. 57: 5-59.
- Sung, G. H., Shrestha, B., Han, S. K., Kim, S. Y. & Sung, J. M. 2010. Growth and cultural characteristics of *Cordyceps cardinalis* collected from Korea. *The Korean Society of Mycology*. 38, 274-281.
- Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L. & Spatafora, J. W. 2007a. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44(3), 1204-1223.
- Sung, H., Yao, Y., Zare, R. y Spatafora, J. 2014. Phylogenetic-based nomenclatural proposals for Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) with new combinations in *Tolypocladium*. *Ima Fungus*. 5(1), 121-134.
- Vargas, F. 1997. *Parques Nacionales de México*. Instituto Nacional de Ecología. Tomado de <http://vivanatur.org/Parques%20Nacionales%20de%20Mexico.pdf>
- Vasco-Palacios, A. M., Suaza, S. C., Castañõ-Betancur, M., & Franco-Molano, A. E. 2008. Conocimiento etnoecológico de los hongos entre los indígenas Uitoto, Muinane y Andoke de la Amazonía Colombiana. *Acta Amazónica*. 38(1), 17-30.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S. & Pell, J. K. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *fungus ecology*. 2(4), 149-

159.

- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J. & Blackwell, M. 2012. Entomopatógenos fúngicos. Patología de insectos. 2, 171-220.
- Wongsa, P., Tasanatai, K., Watts, P. & Hywel-Jones, N. 2005. Isolation and *in vitro* cultivation of the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis*. Mycological Research. 109(8), 900.236-940.
- Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G., Xiong, C., Hu, X., Zhang, S., Zheng, H., Huang, Y., Zhou, Y., Wang, S., Zhao, G., Liu, X., Leger, R. y Wang, C. 2011. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. Genome Biology. 12.
- Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J., & Tang, K. 2009. *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions, and developmental products. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 61(3), 279-291.