

DETERMINACION DE LA VIABILIDAD Y DAÑO CELULAR EN ESPORAS DE *Trichoderma harzianum* MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO.

Ana Laura Muñoz Celaya^{1,2}, Juan Jáuregui Rincón², Angélica Meneses³, Enrique Galindo¹, Leobardo Serrano Carreón¹. ¹Instituto de Biotecnología UNAM ²Universidad Autónoma de Aguascalientes, Depto. Ingeniería Bioquímica. ³Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Farmacia. A. P. 510-3, C.P. 62210 Cuernavaca, Morelos, (777) 3 17 23 88, almuno@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, citometría de flujo, viabilidad

Introducción. *T. harzianum* ha sido utilizado de forma efectiva para combatir plagas de varios hongos fitopatógenos sobre muchos cultivos. En la formulación de productos usados para control biológico un parámetro a evaluar es la viabilidad después de los procesos de acondicionamiento, que es evaluada por la determinación de unidades formadoras de colonias (UFC). Sin embargo, esta técnica incrementa la probabilidad de error y consume mucho tiempo. Ananta y colaboradores, hacen uso de la citometría de flujo para evaluar daños celulares derivados por el secado por aspersión. En general, las células viables son capaces de convertir el diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) no fluorescente en carboxifluoresceína (CF), un producto fluorescente impermeable a través de la pared celular. Por otra parte, las células con paredes intactas son capaces de excluir colorantes de ácidos nucleicos, como el yoduro de propidio (IP). Mediante esta metodología es posible caracterizar una población celular en términos del número de células intactas y viables (fluorescencia verde de CF) y de las células dañadas no viables (fluorescencia roja, PI).

El objetivo de este trabajo fue establecer un método rápido y eficaz para la determinación de la viabilidad de esporas de *T. harzianum*, así como el daño estructural ocasionado después del secado.

Metodología. Las esporas se recuperaron con NaCl 0,9% y Tween 40, 0.05% a partir de placas de PDA y fueron esterilizadas para obtener los diferentes porcentajes de viabilidad. Para el análisis de citometría se utilizó la técnica descrita por Ananta y colaboradores (1) y las muestras se analizaron en el citómetro de flujo Mod. FACSCalibur (Becton Dickinson)

Resultados y discusión. Como se muestra en la figura 1 solo la tinción con IP fue positiva, ya que solo se observa acumulación en el cuadrante 1 que es donde se presentan las células positivas para la tinción de IP (1b), es decir las células con membrana comprometida, sin embargo en el cuadrante 4 no se muestra acumulación, lo que demuestra que la tinción con CFDA no se presentó (1a).

La tinción de IP permitió establecer una correlación (Fig. 2) entre la viabilidad de las muestras y el porcentaje de fluorescencia acumulado en el cuadrante 1, con lo cual se puede evaluar la viabilidad de las muestras mediante

esta técnica, y con esto disminuir el error humano que se presenta al evaluar la viabilidad mediante, cuenta en placa.

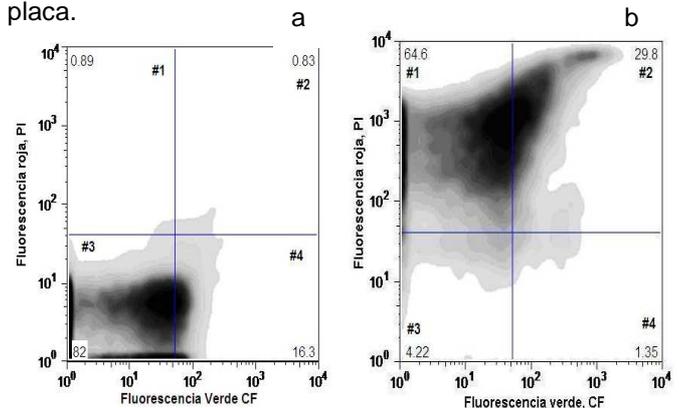


Figura 1. Análisis de densidad de población de esporas de *T. harzianum*. (a) Viabilidad 81%, (b) Viabilidad 0%.

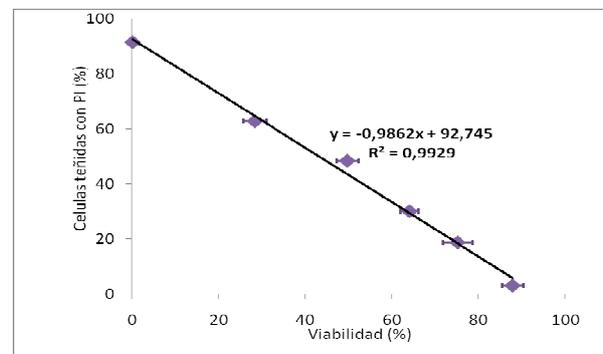


Figura 2. Correlación entre viabilidad en placa de esporas de *T. harzianum* y el porcentaje de población en el cuadrante 1.

Conclusiones. Con el uso de la citometría de flujo, es posible correlacionar la viabilidad de esporas de *T. harzianum* con el porcentaje de células teñidas con IP, y permitirá determinar si el daño celular que se ocasiona durante el proceso de secado, es daño en membrana.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado mediante el proyecto 105938 de Conacyt.

Bibliografía..

1. Ananta, E., Volkert, M. y Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int. Dairy J.*, 15(4): 399-409.