



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Influencia de la criopreservación en perlita y PDA sobre la viabilidad de  
Basidio y Ascomicetos del cepario HUTPL (F)**

**TRABAJO DE TITULACIÓN.**

**AUTORA:** Cuenca Tituana, Cindy Jasmin.

**DIRECTOR:** Cruz Sarmiento, Darío Javier, Ph.D.

**LOJA – ECUADOR**

**2018**



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2018

## **APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Ph.D.

Darío Javier Cruz Sarmiento.

### **DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Influencia de la criopreservación en perlita y PDA sobre la viabilidad de Basidio y Ascomicetos del cepario HUTPL (F)”, realizado por Cindy Jasmin Cuenca Tituana, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo 2018

f) .....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Cindy Jasmin Cuenca Tituana declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Influencia de la criopreservación en perlita y PDA sobre la viabilidad de Basidio y Ascomicetos del cepario HUTPL (F), de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo él Ph.D. Darío Javier Cruz Sarmiento director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Autora: Cindy Jasmin, Cuenca Tituana

Cédula: 0705733988

## **DEDICATORIA**

La presente tesis la dedico a mi familia, de manera especial a mi mamá Teresita Tituana quien fue como la luz que iluminó el camino a seguir en los momentos difíciles personales y universitarios donde no sabía cómo avanzar. A mi padre Ángel Cuenca quien trabaja día tras día para ayudarnos a cumplir nuestros sueños, así mismo dedico este logro a mis hermanos Patricio, Ángel, Gloria y Andrés que han estado siempre en cada etapa de mi vida.

A mis amigos María Hurtado, Karla Alvarado y Jimmy Maldonado por las vivencias y la compañía que han permitido hacer este trabajo más llevadero y sencillo.

**Cindy Cuenca**

## **AGRADECIMIENTO**

En la culminación de mi tesis deseo agradecer al Ph.D. Pablo Ramón Docente Investigador del Departamento de Ciencias Biológicas, en el mismo grado a mi director de tesis Ph.D. Darío Cruz, quienes han mostrado ser fuente de inspiración, esfuerzo, dedicación, conocimientos y demás valores de los cuales yo he sido partícipe, sin embargo, destaco a estos docentes por la importancia que tuvieron en mi formación como investigadora.

A la Universidad “Técnica Particular de Loja” a la cual he tenido el honor de pertenecer, la misma que me ha entregado oportunidades únicas en el ámbito académico, donde he conocido personas que me ayudaron a crecer como profesional y docentes que fortalecieron mis conocimientos.

Mi agradecimiento también va dirigido a mis compañeros del cepario HUTPL (F), en especial a Juan Sebastián Eguiguren , Andrés Chamba, y Oscar Flores por ayudarme a adquirir conocimientos para desarrollar mi tesis, colaborando conmigo cuando he necesitado ayuda con actividades de laboratorio y por la amistad que me ofrecieron les agradezco a todos en general.

Para finalizar agradezco a mi hermana Gloria Cuenca por el apoyo que me ha brindado en cada momento.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Generalidades de los hongos Basidiomicetos y Ascomicetos y su importancia ecológica y biotecnológica.....	6
1.2. Sistemática.....	7
1.3. Características reproductivas de los Hongos Basidiomicetos y Ascomicetos.....	7
1.4. Generalidades de <i>Armillaria</i> , <i>Gymnopus</i> , <i>Lentinus</i> y <i>Pleurotus</i> .....	8
1.5. Generalidades de <i>Pestalotiopsis</i> .....	9
1.6. Importancia de las colecciones de hongos y su preservación.....	9
1.7. Preservación a Corto Plazo.....	9
1.8. Preservación a Largo Plazo.....	10
1.8.1. Congelación.....	10
1.8.2. Criopreservación en Perlita.....	11
1.9. Métodos de Conservación Alternativa.....	11
1.10. Objetivos.....	12
CAPITULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. Cepas de estudio.....	14
2.2. Método 1: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado.....	14
2.3. Método 2. Protocolo de medio PDA.....	15

2.4.	Diseño experimental.....	15
2.5.	Test de viabilidad.....	16
2.6.	Análisis estadístico.....	16
CAPÍTULO III		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		18
3.1.	Viabilidad y estabilidad morfológica de cepas reactivadas.....	19
3.2.	Efecto de la criopreservación de cada cepa estudiada. Comparación entre Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y Protocolo medio PDA, reactivación mensual (12 meses) .....	25
3.3.	Efecto de la criopreservación en cepas estudiadas. Comparación entre Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y Protocolo medio PDA, en una reactivación directa anual y la última reactivación mensual (12vo mes) .....	28
3.4.	Test de chi-cuadrado en evaluación de datos.....	31
CONCLUSIONES.....		36
RECOMENDACIONES.....		37
BIBLIOGRAFÍA.....		38
ANEXOS.....		45
ANEXO 1. Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado.....		46
ANEXO 2. Protocolo medio PDA.....		47
ANEXO 3. Porcentaje de contaminación obtenido en Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA, en 12 meses de reactivación mensual.....		47
ANEXO 4. Porcentaje de contaminación obtenido en Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA, en una reactivación anual.....		48
ANEXO 5. Fotos de cepas reactivadas en el primer mes: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y Medio PDA.....		48
ANEXO 6. Fotos de cepas reactivadas al año: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA.....		50
ANEXO 7. Fotos de contaminación en Perlita .....		52

## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO II

Tabla 1. Datos de coincidencia de similitud molecular para las cepas en estudio en contraste con secuencias de DNA disponibles en la base de datos GenBank-NCBI (National Center for Biotechnology Information) .....	14
---	----

### CAPITULO III

Tabla 2. <i>Armillaria</i> sp. BC017 (HUTPL372) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	19
Tabla 3. <i>Armillaria</i> sp. BC017 (HUTPL372) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	19
Tabla 4. <i>Gymnopus</i> sp. IR079 (HUTPL48) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	20
Tabla 5. <i>Gymnopus</i> sp. IR079 (HUTPL48) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	21
Tabla 6. <i>Lentinus</i> sp. BC009 (HUTPL364) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	21
Tabla 7. <i>Lentinus</i> sp. BC009 (HUTPL364) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	22
Tabla 8. <i>Pestalotiopsis</i> sp. IR128C (HUTPL83) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	22
Tabla 9. <i>Pestalotiopsis</i> sp. IR128C (HUTPL83) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	23
Tabla 10. <i>Pleurotus</i> sp. BC007 (HUTPL362) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	23
Tabla 11. <i>Pleurotus</i> sp. BC007 (HUTPL362) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA) .....	24
Tabla 12. Relación entre reactivación anual (1 año) y mensual (12 <sup>vo</sup> mes) de método perlita de las cinco cepas fúngicas.....	31
Tabla 13. Relación entre reactivación anual (1 año) y mensual (12 <sup>vo</sup> mes) de método PDA de las cinco cepas fúngicas.....	31
Tabla 14. Relación entre método perlita y PDA en una reactivación anual de cinco cepas fúngicas.....	32
Tabla 15. Relación entre método perlita y PDA durante doce meses de reactivación de las cinco cepas fúngicas.....	34

## ANEXOS

Tabla 16. Porcentaje de contaminación obtenido en Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA, en 12 meses de reactivación mensual.....	48
Tabla 17. Porcentaje de contaminación obtenido en Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA, en una reactivación anual.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. Clasificación taxonómica de los hongos en base a datos moleculares...	7
---	---

### CAPITULO II

Figura 2. Esquema de diseño experimental de Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado.....	15
---	----

Figura 3. Esquema de diseño experimental de Protocolo medio PDA.....	16
--	----

### CAPITULO III

Figura 4. Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa <i>Armillaria</i> sp., en método perlita y PDA. ....	25
--	----

Figura 5. Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa <i>Gymnopus</i> sp., en método perlita y PDA.....	26
---	----

Figura 6. Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa <i>Lentinus</i> sp., en método perlita y PDA .....	26
--	----

Figura 7. Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa <i>Pestalotiopsis</i> sp., en método perlita y PDA .....	27
--	----

Figura 8. Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa <i>Pleurotus</i> sp., en método perlita y PDA.....	27
--	----

Figura 9. Grafica de barras comparación de tipo y porcentaje de reactivación (mensual-doceavo mes y anual-primer año) de cinco especies fúngicas método perlita y PDA.....	29
--	----

### ANEXOS

Figura 10. Fotos de cepas reactivadas al mes: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA.....	49
---	----

Figura 11. Fotos de cepas reactivadas al año: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA.....	51
---	----

Figura 12. Contaminación por levaduras en método Perlita.....	52
---	----

## RESUMEN

Los hongos son organismos con elevados potenciales de bioprospección, no obstante, existen limitaciones para su correcto estudio, como, por ejemplo: dificultad de colección, identificación y la preservación *in vitro*. Por tal motivo, este trabajo investigativo, tuvo como finalidad, la implementación y evaluación de métodos para la conservación de cepas fúngicas Basidiomicetos (i.e. *Armillaria* sp., *Gymnopus* sp., *Lentinus* sp., y *Pleurotus* sp.) y Ascomicetos (i.e. *Pestalotiopsis* sp.) a largo plazo. Dos métodos de conservación fueron experimentados, así está el Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y Protocolo medio PDA, donde se inoculó micelio de las diferentes cepas y se monitoreó su reactivación anual y mensualmente durante un año. Los datos obtenidos indican una reactivación del 100% en el medio PDA para las cepas *Gymnopus* sp., *Lentinus* sp., y *Pestalotiopsis* sp. No obstante, el método Homolka Perlita (-80°C) modificado permitió reactivar y mantener iguales características macro y microscópicas para todas las cepas mostrándose como, el más generalista para las especies evaluadas. Estos datos indican que las cepas reaccionan de forma distinta según el método de conservación.

**Palabras clave:** criopreservación, *Armillaria*, *Gymnopus*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Pestalotiopsis*, reactivación.

## ABSTRACT

Fungi are organisms with high levels of bioprospecting, however, there are limitations to their correct study, such as: difficulty of collection, identification and *in vitro* preservation. For this reason, this research work, has the following purpose, the implementation and evaluation of methods for the conservation of basidiomycete fungal strains (ie, *Armillaria* sp., *Gymnopus* sp., *Lentinus* sp., and *Pleurotus* sp.) and Ascomycetes (ie, *Pestalotiopsis* sp.) in a long term. Two conservation methods were assement, the first one is the Perlite Homolka Protocol (-80°C) modified and the second one the PDA medium Protocol, where mycelium was inoculated from the different strains and its reactivation was monitored annually and monthly for one year. The data obtained indicate a reactivation of 100% in the PDA medium for the strains *Gymnopus* sp., *Lentinus* sp., and *Pestalotiopsis* sp. however, the Homolka Perlite modified method (-80°C) allowed to keep the macro and microscopic characteristics for all the strains, for this reson we suggest this method and medium as the most generalist for the evaluated species. These data indicate that the strains react differently according to the conservation method.

**Keywords:** cryopreservation, *Armillaria*, *Gymnopus*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Pestalotiopsis*, reactivation.

## INTRODUCCIÓN

La presente investigación aborda el tema de criopreservación, el cual fue explorado en 1960 por Hwang, cuando conservó especies fúngicas a temperaturas extremadamente bajas (Hwang, 1968), siendo en la actualidad, uno de los métodos más utilizados, debido a la disminución de las actividades metabólicas en toda célula, tejido u organismo (Pinzón, Bustamante, & Buitrago, 2009). Actualmente existen varios métodos de criopreservación de hongos, sin embargo, para el presente estudio se seleccionaron dos métodos experimentales: Protocolo Homolka Perlita (HPP) y Protocolo medio Agar Papa Dextrosa (PDA). Para evaluar la eficacia de los mismos en la preservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y reactivación de cepas Basidiomicetos y Ascomicetos pertenecientes al cepario HUTPL (F). Estos grupos poseen un potencial económico y ecológico amplio, como, por ejemplo, en la industria alimenticia las setas que son Basidiomicetos y Ascomicetos (Boa, 2005).

La información del trabajo se distribuyó en capítulos. El **primer capítulo** aborda la importancia de la criopreservación, además de dar un enfoque general de los hongos, para de esta manera tener una mejor comprensión del tema, una parte esencial de este capítulo constituyen los objetivos del presente trabajo. El **segundo capítulo**, detalla la metodología experimental que fue utilizada para la recopilación de datos, que servirá para llegar a conclusiones sobre el mejor método de criopreservación. En el **tercer capítulo** se analizan los resultados y discusión en el cual se interpretarán los resultados obtenidos haciendo una comparación con la bibliografía del tema previamente analizado.

En el cepario de la Universidad Técnica Particular de Loja HUTPL(F), se cuenta con una colección *in vivo* de aproximadamente 120 cepas de hongos siendo los más abundantes los grupos Basidiomicetos y Ascomicetos. Sin embargo, los métodos utilizados para la conservación de las cepas de hongos en la colección, se basan en, métodos de conservación a corto plazo, que generalmente no garantizan el detenimiento completo de su metabolismo, ni la misma eficacia en todas las especies, consumiendo tiempo, personal, espacio, presentando mayor contaminación, cambios morfológicos, fisiológicos y dificultad de adaptación a medios (Jong & Davis, 1987).

Bajo estos antecedentes evaluaremos los dos métodos de criopreservación: Protocolo Homolka Perlita ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) modificado y protocolo medio PDA. Se ha reportado a la criopreservación con mayor eficacia en la estabilidad genética en algunas cepas fúngicas (Gato, 2010).

El objetivo del estudio entonces se centra en la implementación de estos métodos a largo plazo, para aplicarlos a cepas de Basidio y Ascomicetos del cepario HUTPL(F), y verificar si son efectivos, o si tiene alguna influencia en la reactivación y características morfológicas bajo criopreservación. La factibilidad de materiales, instrumentos y equipos con los que cuenta el cepario HUTPL (F), permitió realizar el proyecto, para la posterior implementación de estos nuevos protocolos.

En cuanto a la metodología usada, evaluamos cinco cepas de hongos (Basidiomicetos y Ascomicetos) proporcionadas por el cepario HUTPL, con dos métodos de criopreservación: Protocolo Homolka Perlita (-80 °C) modificado y protocolo medio PDA a -80°C. Utilizando el protocolo Homolka Perlita modificado, evaluamos la eficacia de la perlita (portador de micelio), enriquecido con medio PDA y glicerol (agente crioprotector), para mantener la viabilidad de las cepas (Gupta, Kumar, Gomes, & Kuhad, 2012). Mientras que en el protocolo medio PDA, se valoro la resistencia de cada cepa, colocada en medio PDA a -80°C, para evaluar la viabilidad de las cepas. La eficacia en la reactivación de los hongos criopreservados en cada método fue evaluada cada 30 días durante doce meses y una reactivación anual.

**CAPÍTULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

### **1.1. Generalidades de los hongos Basidiomicetos y Ascomicetos y su importancia ecológica y biotecnológica**

Los hongos son organismos talófitos, eucariotas, heterótrofos, y pueden ser saprófitos, parásitos o vivir en simbiosis mutualista (p. ej. micorrizas), e intervienen en el reciclaje de nutrientes (Nabors, 2006). Carecen de clorofila, forman hifas, poseen núcleo, su pared celular está hecha de celulosa, quitina o ambas (Sutton, 1996).

Pese al gran valor ecológico y económico de los hongos, su estudio es mínimo, se estima una cantidad de 1.500.000 especies en el mundo, de las cuales se conoce entre 5% y 10%. (Hawksworth, 2001). De este porcentaje, unas 30,000 especies pertenecen al grupo taxonómico Basidiomicetos, un grupo de importancia por su aporte de recambio de nutrientes en la naturaleza. Además, forman asociaciones simbióticas mutualistas con árboles de bosques boreales conocidas como ectomicorrizas. Algunas especies, son causantes de enfermedades en plantas como las royas y los carbones (Rojas, 2013). Así mismo especies basidiomicetos especialmente hongos de la podredumbre blanca, son capaces de degradar compuestos aromáticos y heterogéneos, gracias a su complejo enzimático inespecífico con actividad oxidativa. Este grupo por su utilidad como biorremediador, es usado en la degradación de una amplia variedad de sustancias tóxicas y recalcitrantes de suelos y aguas contaminadas (p. ej. industrias textil y papelera). Presenta actividad antifúngica, fitotóxica y nematocida lo cual le da un marcado valor en la agricultura (Rojas, 2013).

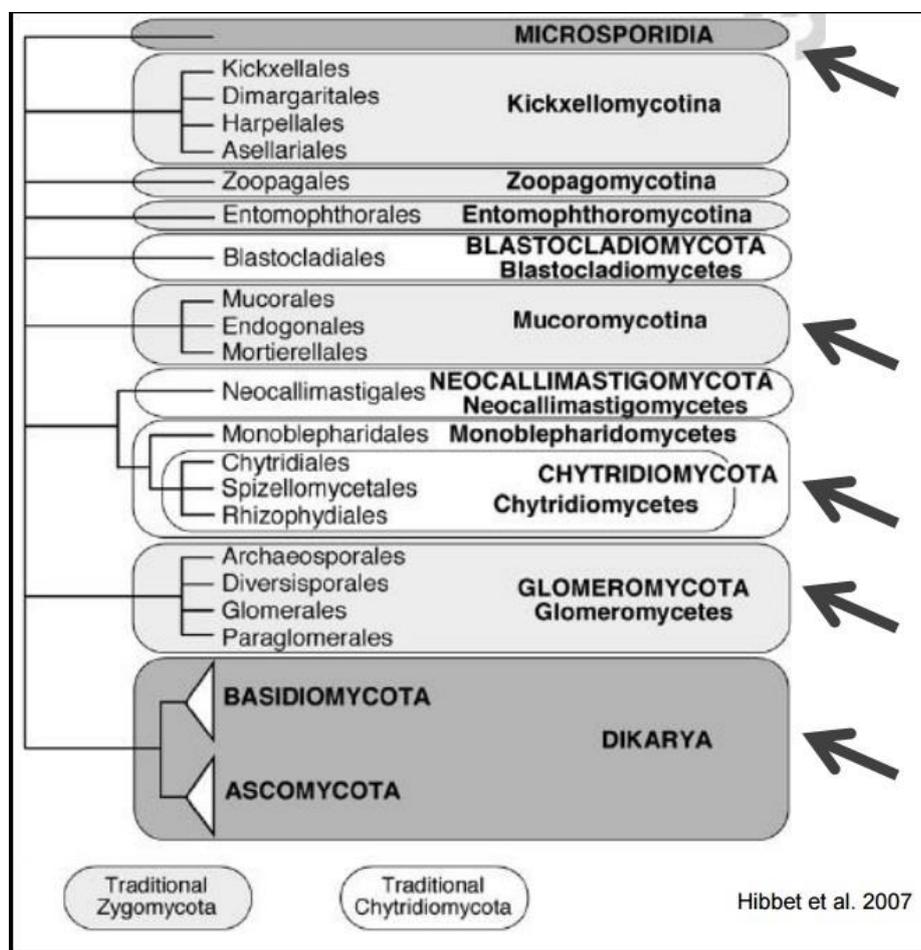
Otro grupo de gran importancia lo constituyen los Ascomicetos (aprox. 32.000 especies), que a su vez se clasifican en varios grupos; uno de ellos es el de los Pirenomicetes, que agrupan la mayoría de las especies de microhongos. Entre los Pirenomicetes hay especies que causan enfermedades en las plantas y que pudren madera y hojas. Algunos tienen potencial para ser usados en el control biológico de plagas y enfermedades de cultivos agrícolas. Otros (ej. *Penicillium*) pueden proporcionar compuestos químicos (ej. antibióticos) que sirven para la producción de fármacos (Chaverri, 2010).

En el *filo* Ascomycota se encuentran especies parásitas facultativas u obligados de plantas y animales (Cabral, Sobrado, & Romero, 2013). Muchas de estas especies no se evidencian en el huésped fácilmente, sino que se reconocen cuando producen daño o cambios visibles, esto se debe a que las esporas que producen son estacionales o efímeras. Estos hongos se asocian con una gran variedad de plantas y animales. Un ejemplo es la asociación con algas verdes o cianobacterias formando hongos

liquenizados, (Cabral et al., 2013). Varios ascomicetos también son comestibles como por ejemplo especies de *Morchela* “colmenilla” (Boa, 2005).

### 1.2. Sistemática

En el 2007 con la ayuda de estudios moleculares, Hibbett, y otros sugirieron una nueva clasificación para los hongos donde se aceptó un reino, un subreino, siete filios, diez subfilios, 35 clases, 12 subclases y 129 órdenes, quedando la nomenclatura jerárquica de la siguiente manera (orden, subclase, clase, subfilio, filio, subreino y reino). Todos los hongos filamentosos con hifas septadas y esporas sin flagelos se clasificaron en el subreino Dikarya. Dicho subreino Dikarya, a su vez está subdividido en el *filio* Basidiomicetos y Ascomicetos (Hibbett et al., 2007) Figura1.



**Figura 1.** Clasificación taxonómica de los hongos en base a datos moleculares.

Fuente y Elaboración: (Hibbett et al., 2007).

### 1.3. Características reproductivas de los Hongos Basidiomicetos y Ascomicetos.

Los hongos pueden tener una reproducción sexual o asexual. La reproducción sexual o meiospórica se produce a través de la fusión de los núcleos de dos hifas

sexualmente compatibles (Pontón, Moragues, Gené, Guarro, & Quindós, 2002). Por otra parte en la reproducción asexual o mitospórica, hay producción de esporas meióticas de dos clases endógenas y exógenas, que se producen por fisión, fragmentación y gemación. Algunas cepas de Basidiomicetos y Ascomicetos generan esporas asexuales llamadas conidios formadas en el conidióforo (Pontón et al., 2002).

En la reproducción sexual de Basidiomicetos y Ascomicetos éstos poseen órganos reproductivos de esporas meióticas denominados esporangios. En basidiomicetos se denominan basidiocarpos que se caracterizan por ser células terminales en forma de clavo en la que se produce la cariogamia y la meiosis, produciendo generalmente cuatro esporas exógenas (basidiósporas) (Jenssen & Salisbury, 1988; Lindorf, Parisca, & Rodríguez, 1991).

Por otra parte los Ascomicetos generan las esporas endógenas en el ascocarpo, donde hay una reproducción sexual (**Plasmogamia**) entre los gametangios (ascogonio y el anteridio), se produce una **fase dicariótica** donde los núcleos se encuentran apareados sin estar fusionados (Piepenbring, 2015) y luego se produce la **cariogamia** en las ascas dando lugar a un cigoto  $2n$ , que por división meiótica origina cuatro núcleos haploides, éstos últimos se dividen por mitosis dando como resultado una asca madura con ocho ascosporas generalmente (Alexopoulos & Mims, 1985).

#### **1.4. Generalidades de *Armillaria*, *Gymnopus*, *Lentinus* y *Pleurotus***

Los géneros *Armillaria*, *Gymnopus*, y *Pleurotus*, pertenecientes al orden Agaricales en su mayoría son setas típicas con pie, sombrero, carne fibrosa e himenóforo de láminas, no obstante el género *Lentinus* el cual pertenece al orden Polyporales, comúnmente forma himenóforo de poros (Bon, 2005). Todos estos grupos de hongos son parte del filo Basidiomicetos (Hibbett et al., 2007) con características generales pero distintivas entre los géneros, por ejemplo:

- a) *Armillaria*:** En este género, las especies tienen gran importancia por su comportamiento mayoritariamente saprotrófico pero puede ser parasítico de especies forestales, en donde crecen sobre la base de los troncos y raíces viejas, difundiéndose de una planta a otra por contacto de raíces infectadas, con sus rizomorfos (cordones hifales) alcanzan nuevos huéspedes (González & Abad, 1976).
- b) *Gymnopus*:** Por lo general saprotrófos de hojarasca y madera muerta, en algunos lugares estos hongos cuando están jóvenes son consumidos como alimento (p. ej. *G. confluens*), pero cuando maduran no sirven para consumo por su dureza, o por incremento de sustancias tóxicas (Jang et al., 2016).

- c) *Lentinus*:** Especies de este género poseen cierto interés culinario donde se destaca su contenido de vitaminas, aminoácidos (Minato, Mizuno, Terai, & Tsuchida, 1999), lectinas y terpenoides (Wasser & Weis, 1999). Otras especies del género se consideran antitumorales, antibacteriales, e inclusive antivirales, por la gran cantidad de enzimas que producen, muchas de ellas también buenas para la degradación y/o transformación de residuos agroindustriales (Zheng & Shetty, 2000).
- d) *Pleurotus*:** Un género que es ampliamente reconocido por contener especies comestibles (Rodríguez-Macias, 1996). Algunas especies contienen polifenoles por lo que se usan en la industria alimentaria y médico- farmacéutica (Beltrán, Morris, de la Cruz, Quevedo, & Bermúdez, 2013).

### **1.5. Generalidades de *Pestalotiopsis***

El género *Pestalotiopsis*. pertenece al *filo* Ascomycota. En forma asexual producen conidióforos (anelídicas) en un cuerpo fructífero duro (aecervulo o picnidio) y sexualmente producen ascas en peritecios (Maharachchikumbura, Guo, Chukeatirote, Bahkali, & Hyde, 2011). Varias especies dentro de este género se consideran hongos endofíticos, recibiendo una gran atención, no sólo por su papel como un patógeno de plantas, sino también como una fuente de diversos metabolitos secundarios, que han mostrado potencial microbiano y antitumoral, ya que algunas especies producen taxol el cual es un agente antitumoral (diterpenoide) (Kathiravan & Sri Raman, 2010; Maharachchikumbura et al., 2011). Actualmente se estudia este género debido a la capacidad de ciertas especies para degradar poliuretano líquido. (Ayala, 2015).

### **1.6. Importancia de las colecciones de hongos y su preservación**

La preservación segura de cultivos puros y taxonómicamente establecidos busca asegurar la viabilidad y características morfológica, fisiológica, y la integridad genética, la cual será la base para su posterior uso en estudios por ejemplo sistemáticos, de biodiversidad y biotecnológicos (L. Homolka et al., 2007; Mueller, Bills, & Foster, 2004).

### **1.7. Preservación a corto plazo**

El método de crecimiento continuo es un cultivo en medio agar, donde se transfiere el micelio en tubos o placas Petri, los cuales se almacenan a temperaturas de 5 a -20°C. Este método es el más empleado en colecciones pequeñas, con duraciones de menos de un año por su costo y equipamiento. Sin embargo, presenta desventajas como el tiempo que requiere la resiembra del hongo, las altas probabilidades de contaminación, además que se presentan cambios morfológicos y fisiológicos del hongo (Humber, 1994; Singleton, Mihail, & Rush, 1992).

## **1.8. Preservación a largo plazo**

Es utilizado para minimizar el riesgo de cambios a nivel genético de las cepas fúngicas conservadas. Entre los aspectos importantes a considerarse se encuentran: la edad de las células (células que han iniciado la fase estacionaria de la curva de crecimiento son las más adecuadas), la temperatura utilizada para el almacenamiento (que debe ser lo más baja posible para detener el metabolismo celular) y el contenedor de la cepa (crioviales) (Alarcon, 2006; M. D. García & Uruburu, 2000).

Al someter la cepa fúngica a bajas temperaturas se genera la formación de cristales de hielo dentro de las células, causando efectos negativos en la etapa de reactivación, por lo cual se usan agentes crioprotectores (ACP) que disminuyen el efecto adverso de la cristalización celular que provoca el rompimiento de las paredes celulares (Sánchez & Corrales, 2005). Estos ACP se utilizan dependiendo del tipo de microorganismos que se va a conservar, un ejemplo de esto lo constituye la conservación de estructuras fúngicas donde se utiliza glicerol (Pinzón et al., 2009). Sin embargo, algunos hongos pueden crear sus propios ACP (p. ej. *Humicola marvinii*), lo cual les da ventaja en su supervivencia (Robinson, 2001).

### **1.8.1. Congelación.**

Los protocolos estandarizados de criopreservación buscan que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, recomendándose descongelación de las células a 37°C (M. D. García & Uruburu, 2000). En estudios realizados con anterioridad se demuestra que con una etapa de pre-enfriamiento de las colonias a 4°C por hora, seguido por la congelación a -80°C se conservan mucho mejor las cepas (Juarros, Tortajada, García, & Uruburu, 1993). Cuando la temperatura va disminuyendo en forma lenta la congelación externa ocurre antes de la formación de hielo debido a la pérdida de agua intracelular por un desbalance osmótico. Además las células más permeables, toleran velocidades de enfriamiento más rápidas (Lee, 1992).

La duración máxima de almacenamiento varía según el método y la especie que se conserva. Así tenemos como ejemplo cepas conservadas mediante métodos como liofilización y criopreservación a -80°C (1 a 3 años), y mediante supresión de la evaporación (1,2,4,6 y 7 años) (Rico et al., 2004). Los cultivos esporulados pueden ser sellados herméticamente y almacenados en un congelador a -20°C (Carmichael, 1956, 1962) o almacenados a -70°C mejorando la supervivencia y transferencia (Pasarell & McGinnis, 1992).

### **1.8.2. Criopreservación en perlita.**

La perlita es un mineral de silicato de aluminio volcánico con capacidad de retención de agua. Por lo cual la criopreservación en perlita busca que el micelio del hongo crezca dentro de la estructura porosa de la perlita y ésta actúe como un portador del micelio fúngico con humedad (Ladislav Homolka, Lisá, & Nerud, 2006). La criopreservación en perlita ha demostrado ser adecuada en diferentes grupos taxonómicos de hongos, incluyendo levaduras, y también para los hongos que no pueden sobrevivir a otros procedimientos de conservación utilizadas rutinariamente, en diferentes cepas de hongos sensibles que requieren un tratamiento especial (p. ej. *Phallus hadriani*) (Ladislav Homolka, Lisá, Eichlerová, & Nerud, 2001).

Aún no está claro cuál es el efecto protector de la perlita para el micelio de los hongos criopreservados, pero algunos autores como Sato, Sukenobe, & Nakagiri (2012) proponen que, gracias a la estructura porosa de la perlita, el hongo invade los microporos internos y así se protege, por medio de crecimiento en su interior.

### **1.9. Métodos de conservación alternativa**

Los métodos alternativos como el aceite mineral son altamente aplicados, por su bajo costo en los cuales se puede suspender micelios esporulados o no esporulados, que a su vez pueden o no ser sensibles a la congelación o secado (Humber, 2012). Este método en aceite mineral es fácil y reproducible por lo cual no se necesita un especialista, ya que el procedimiento es básico donde se da la transferencia de micelio en crecimiento desde agar hasta su posterior agregación en aceite. Este método es rápido, económico y muestra una baja tasa de contaminación y pérdida de viabilidad para algunos hongos. Se ha registrado el mantenimiento de la viabilidad luego de 25 años de almacenamiento (Sharma & Smith, 1999). Por otro lado, este método presenta algunas desventajas, ya que el mantenimiento es por lo general a temperatura ambiente la misma que es variable por lo que se puede afectar la fisiología o genética de las especies por medio de generación de mutaciones debido a que su metabolismo sigue completamente activo (Burdshall & Dorworth, 1994; Johnson & Martin, 1992).

El método de agua destilada es bastante similar al de aceite mineral, donde se sumerge igualmente al hongo en agua destilada, con lo que se pretende reducir el metabolismo y el crecimiento evitando cambios morfológicos en ciertas especies (Nakasone, Peterson, & Jong, 2004). Por lo general este método se utiliza cuando no hay recursos para congelado o en hongos que no toleran el desecado o a la ultracongelación (Montesinos, Ayala, & Berlanga, 2015). Entre las principales

desventajas de este método se encuentra pérdida de viabilidad en algunas especies (p.ej. *H. capsulatum*) donde se muestra pérdida de viabilidad después del primer año (Fernández et al., 2012). Otra especie evaluada *Botrytis* sp., pierde su viabilidad antes de un año (Alarcon, 2006).

## **1.10. Objetivos**

### **General**

Analizar la influencia de dos métodos de criopreservación, Protocolo Homolka Perlita (-80 °C) modificado y Protocolo Medio PDA, en la viabilidad de cepas de hongos basidio y ascomicetos del cepario HUTPL (F).

### **Específicos**

- Mantener cepas de hongos basidio y ascomicetos, en dos métodos de criopreservación: Protocolo Homolka Perlita (-80 °C) modificado y Protocolo medio PDA, en doce reactivaciones mensuales continuas y una reactivación anual.
- Determinar si se mantiene la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica en los dos métodos de criopreservación: Protocolo Homolka Perlita (-80 °C) modificado y Protocolo medio PDA, para cepas de hongos basidio y ascomicetos después de doce reactivaciones mensuales continuas y una reactivación anual.
- Evaluar si no hay diferencia entre la última reactivación mensual continua y una reactivación anual, en los dos métodos de criopreservación: Protocolo Homolka Perlita (-80 °C) modificado y Protocolo medio PDA.
- Evaluar la reacción de cada cepa frente a los dos métodos de criopreservación: Protocolo Homolka Perlita (-80 °C) modificado y Protocolo medio PDA.

**CAPÍTULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Cepas de estudio

Las cinco cepas fueron entregadas por el cepario fúngico de la Universidad Técnica Particular de Loja (HUTPL-CF) y caracterizadas molecularmente. Las cepas corresponden a cuatro Basidiomicetos (tres Agaricales y un Polyporal) y un Ascomicetos (Xylarial) colectados del bosque montano tropical de la provincia de Zamora Chinchipe ("La Pituca" 4°07'56.06"S latitud, 78°56'56.06"O longitud) ("San Francisco" 3°58'31.75"S latitud, 79°4'45.63"O longitud) (Tabla 1).

Las cinco cepas fueron primeramente replicadas en medio PDA por duplicado, seguidas de incubación a 27°C durante una semana.

**Tabla 1.** Datos de coincidencia de similitud molecular para las cepas en estudio en contraste con secuencias de DNA disponibles en la base de datos GenBank-NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Código HUTPL(CF)	Género y especie en BLAST	Código de Accesion	% de Cobertura	% de Similitud	e-value
48 (IR079C)	<i>Gymnopus collybioides</i> isolate	<a href="#">AF505772.1</a>	52%	87%	2e-135
	<i>Basidiomycota</i> sp.	<a href="#">KF221095.1</a>	45%	85%	8e-109
	<i>Collybia johnstonii</i> isolate	<a href="#">AY822014.1</a>	50%	83%	2e-104
362 (BC007)	<i>Pleurotus djamor</i> voucher	<a href="#">KP012957.1</a>	100%	99%	0.0
	<i>Pleurotus calyptratus</i> isolate	<a href="#">AY450338.1</a>	98%	95%	0.0
	<i>Pleurotus opuntiae</i> isolate	<a href="#">AY450340.1</a>	97%	92%	0.0
364 (BC009)	<i>Lentinus tigrinus</i> strain	<a href="#">FJ755219.1</a>	96%	96%	0.0
	<i>Lenzites tricolor</i> strain	<a href="#">FJ755220.1</a>	96%	96%	0.0
	<i>Fungal endophyte</i> isolate	<a href="#">KR015073.1</a>	96%	96%	0.0
372 (BC017)	<i>Armillaria puiggarii</i> voucher	<a href="#">KU170954.1</a>	57%	99%	0.0
	<i>Cortinarius violaceus</i> voucher	<a href="#">AY669578.1</a>	79%	87%	0.0
	<i>Cortinarius atrovirens</i> voucher	<a href="#">EU057010.1</a>	80%	87%	0.0

Fuente y Elaboración: Autor

## 2.2. Método 1: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado

- Los crioviales contenían 2g de perlita más 1 ml de medio PDA semilíquido (9.75 g de PDA + 50 ml de Glicerol + 950 ml de agua destilada). Todo el contenido de medio más perlita ocupó aproximadamente  $\frac{1}{4}$  del criovial.
- Cada cepa (aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>) fue transferida a los crioviales, seguido de una incubación durante 14 días a 24°C.
- Al final de los 14 días los crioviales con la cepa en crecimiento, se colocaron a -4°C durante 24 horas, y luego su posterior almacenamiento en un congelador a -80°C.

- d) Para la reactivación mensual o anual, se procedió con la aclimatación de las cepas directo desde el congelador a baño maría a 37°C durante 15 minutos y su posterior transferencia de un gránulo de perlita en medio PDA sólido en cajas Petri.

### 2.3. Método 2: Protocolo de medio PDA

- a) Los crioviales contenían únicamente 1,5 ml de medio PDA (39 g en 1000 ml de agua purificada).
- b) Posteriormente se transfirió ~2 mm<sup>2</sup> de micelio en los crioviales, seguido de una incubación durante 3 a 14 días a 24°C, dependiendo de la especie.
- c) Al final de los 14 días los crioviales con la cepa en crecimiento, se colocaron a -4°C durante 24 horas, y luego se almacenaron en un congelador a -80°C.
- d) Para la reactivación mensual o anual, se procede con la aclimatación de las cepas directo desde el congelador a baño maría a 37°C durante 15 minutos y se realizó la transferencia de micelio a medio PDA en cajas Petri.

### 2.4. Diseño experimental

El diseño de conservación Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado, consiste en cinco réplicas para 12 reactivaciones mensuales y cinco réplicas para una reactivación anual, con su respectivo control negativo: perlita+ PDA+ glicerol 5%, sin hongo (Figura 2).

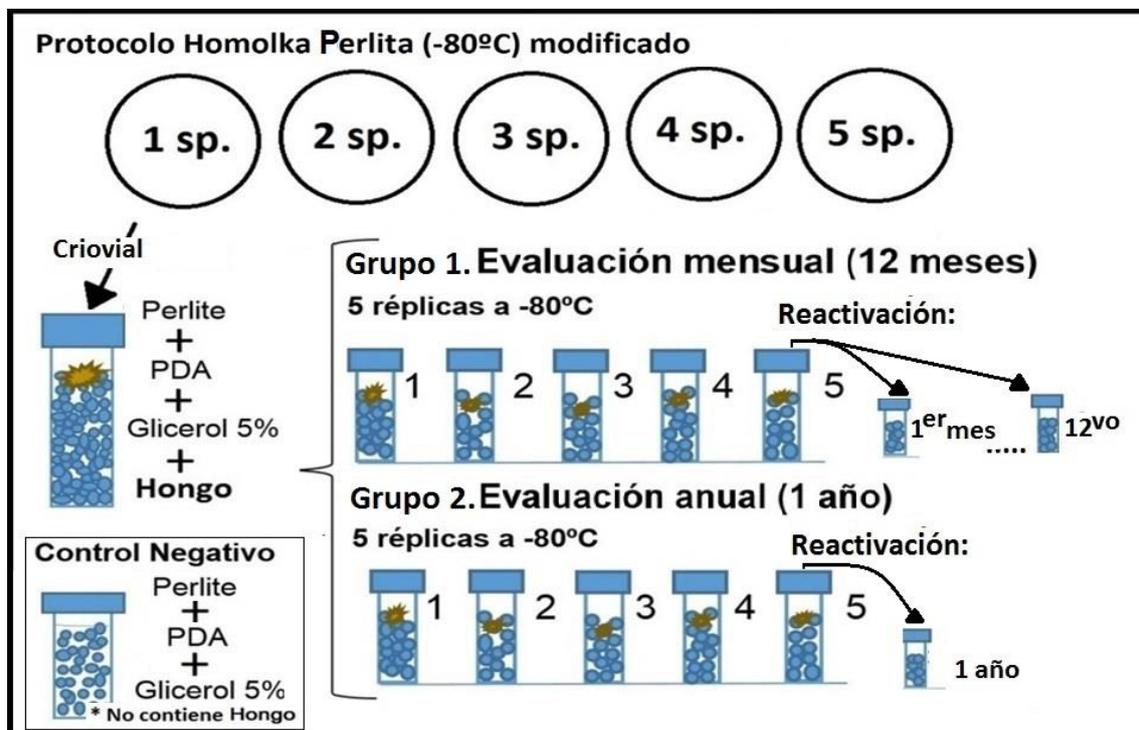
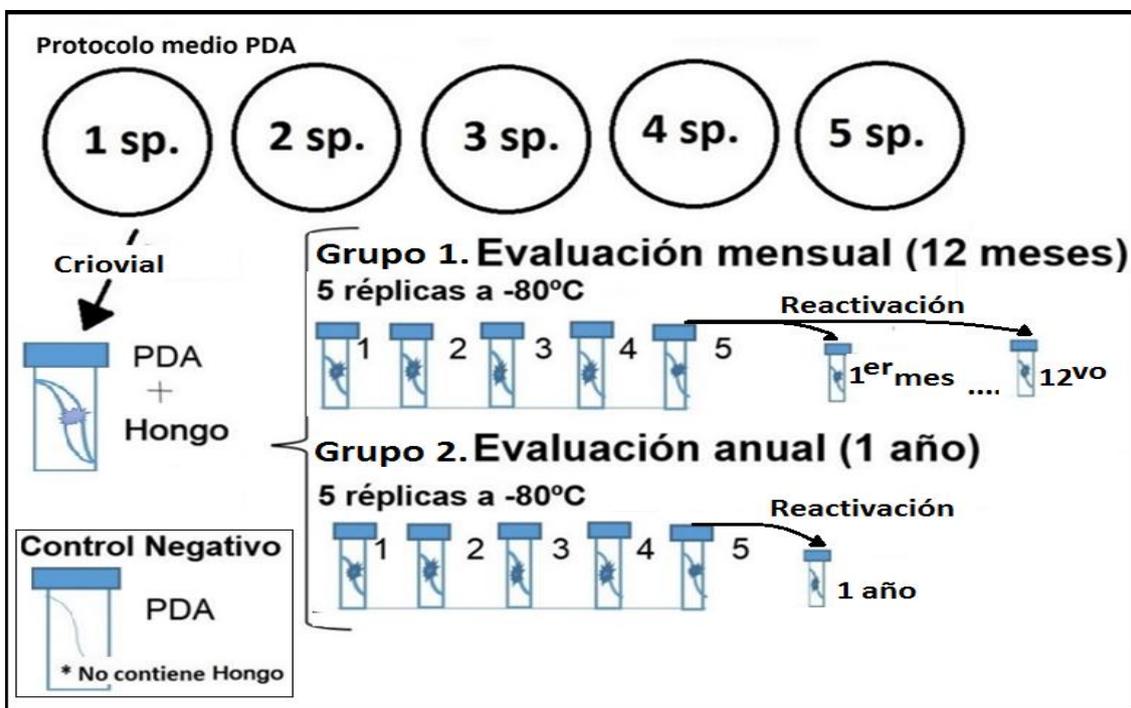


Figura 2. Esquema de diseño experimental de Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado.

Fuente y Elaboración: Autor

El método de conservación Protocolo medio PDA, consiste en cinco réplicas para 12 reactivaciones mensuales y cinco réplicas para una reactivación anual, con su respectivo control negativo: PDA, sin hongo (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de diseño experimental de Protocolo medio PDA.

Fuente y Elaboración: Autor

## 2.5. Test de viabilidad

En cada reactivación se determinó la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las cepas estudiadas.

- a) **Viabilidad:** Se determinó, mediante el crecimiento de las cepas en el medio PDA.
- b) **Pureza y estabilidad morfológica:** se consideró que la colonia es pura si presentaba similitud con la cepa original de la cual se tomó datos de sus características como por ejemplo color del micelio, crecimiento superficial o interno en el medio, dimensiones de hifas, al microscopio la presencia de clamps (Basidiomicetos) o conidióforos para Ascomicetos. En el caso de las preparaciones de placas para microscopia se aplicó Phloxin al 1% como tinción.

## 2.6. Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados y almacenados en Excel como base de datos acorde a las variables ("tipo de tratamiento" y "tiempo de supervivencia"). Las representaciones se hicieron mediante: diseño de gráficas de líneas, y diagrama de barras. En busca de

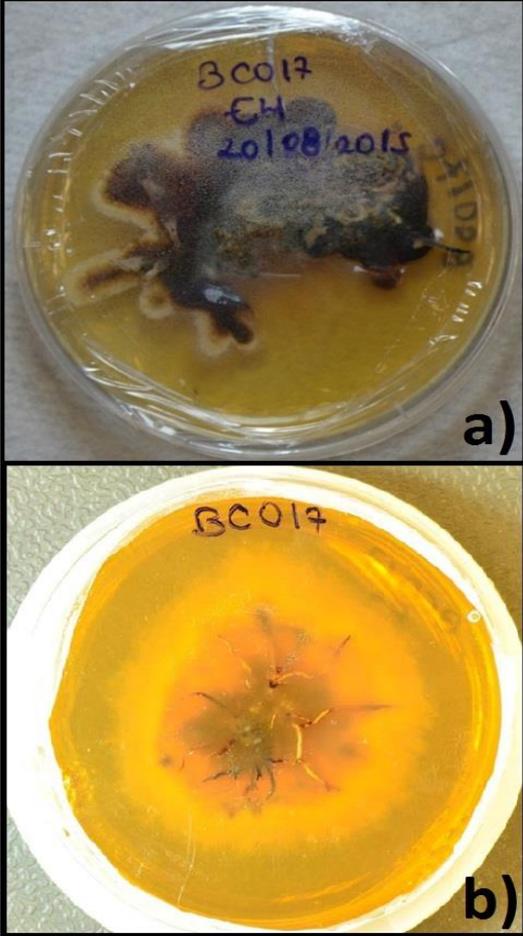
una diferencia significativa entre las variables, se utilizó la prueba Chi- cuadrado. El programa estadístico aplicado para los análisis fue R (Ihaka, 1998; Kleiber & Zeileis, 2008).

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Viabilidad y estabilidad morfológica de cepas reactivadas

Las cepas estudiadas luego de su primera reactivación presentaron características distintivas para cada una como se muestra a continuación (Tablas 2- 11). Las características encontradas y descritas se mantuvieron en cada reactivación subsiguiente, ya haya sido mensual o anual, según el caso.

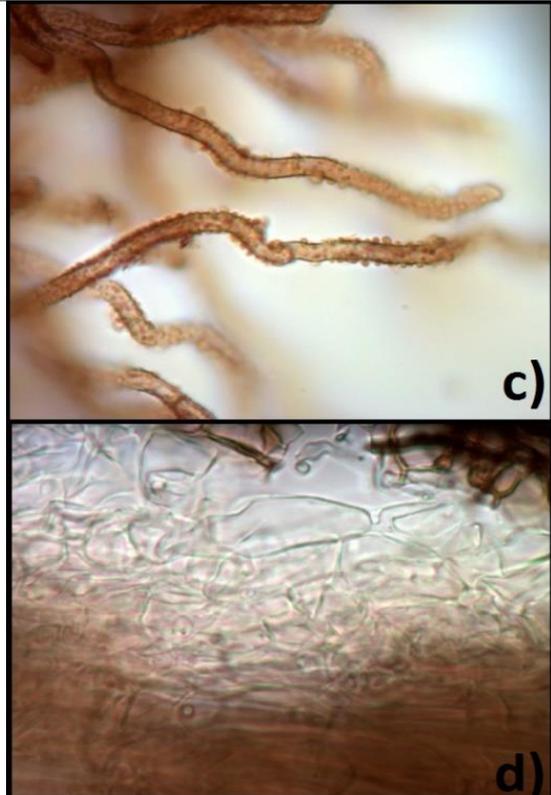
**Tabla 2.** *Armillaria* sp. BC017 (HUTPL372) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS	
<p>a) En el cultivo se observa la formación de rizomas de coloración café típicos en especies del género <i>Armillaria</i>. El crecimiento fue lento de aproximadamente 5 mm en dos semanas (Figura 4 a).</p> <p>b) Cambio de coloración del medio sólido de translúcido blanquecino a translúcido amarillento (Figura 4 b).</p>	

Fuente y Elaboración: Autor

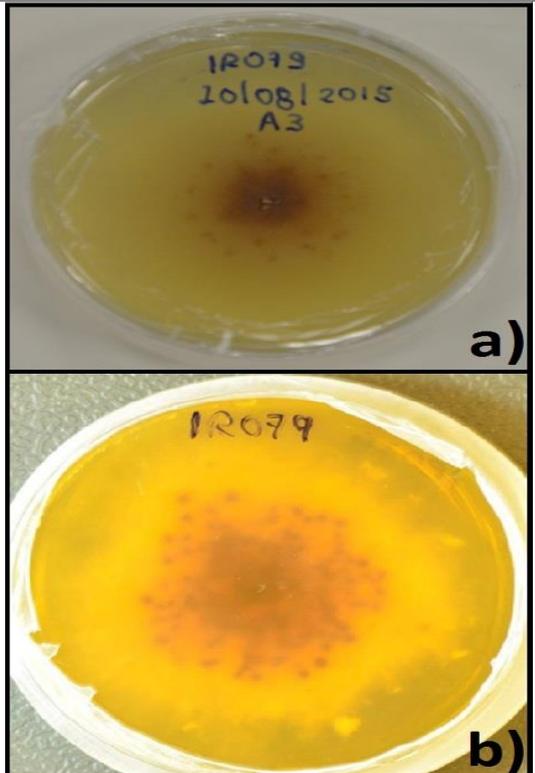
**Tabla 3.** *Armillaria* sp. BC017 (HUTPL372) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

### DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS

<p><b>c)</b> Hifas generativas hialinas, con pared celular delgada seguido de engrosamiento con pared celular gruesa y color café. Las hifas aparentemente son ornamentaciones en forma de papilas (Figura 5 c).</p> <p><b>d)</b> Zonas con apariencia pseudoparenquimatosa (González &amp; Abad, 1976) (Figura 5 d).</p>	
---	--

Fuente y Elaboración: Autor

**Tabla 4.** *Gymnopus* sp. IR079 (HUTPL48) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

<b>DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS</b>	
<p><b>a)</b> Colonias planas, su crecimiento es lento y uniforme, el color del micelio en la superficie es blanco, conforme crece se torna a un café oscuro (Figura 6 a).</p> <p><b>b)</b> Cambio de la tonalidad del medio a amarillo, formación de colonia en forma de anillo concéntrico (Figura 6 b).</p>	

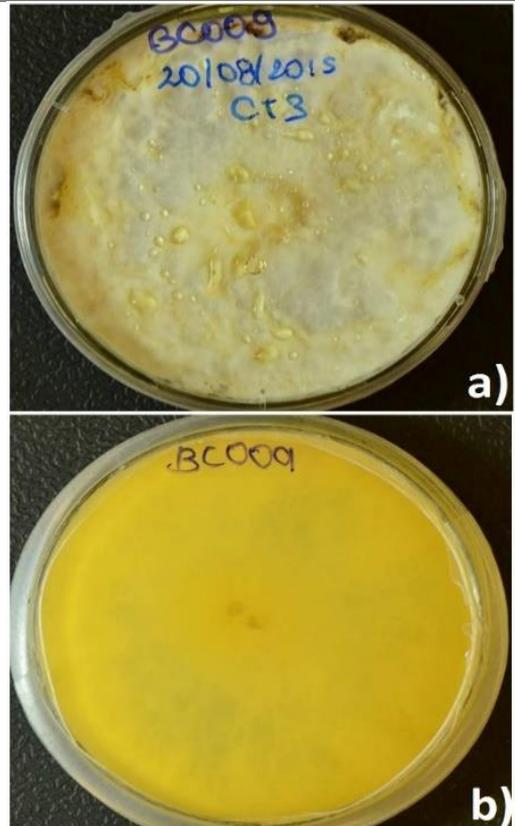
Fuente y Elaboración: Autor

**Tabla 5.** *Gymnopus* sp. IR079 (HUTPL48) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS	
<p>c) Se observan hifas septadas, y en se puede observan la formación de clamps (Figura 7 c).</p>	

Fuente y Elaboración: Autor

**Tabla 6.** *Lentinus* sp. BC009 (HUTPL364) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS	
<p>a) El cultivo presenta crecimiento a una velocidad moderada, cubriendo la caja de Petri (50mm) en 1 semana, el micelio se expande a los bordes de la caja cuando no tiene lugar para crecer, conforme el micelio avanza se torna más duro y cambia su tonalidad a un café con formación de burbujas de agua color amarillo. (Figura 8 a).</p> <p>b) Cambio de la tonalidad del medio a amarillo, formación de colonia en forma de anillo concéntrico (Figura 8 b).</p>	

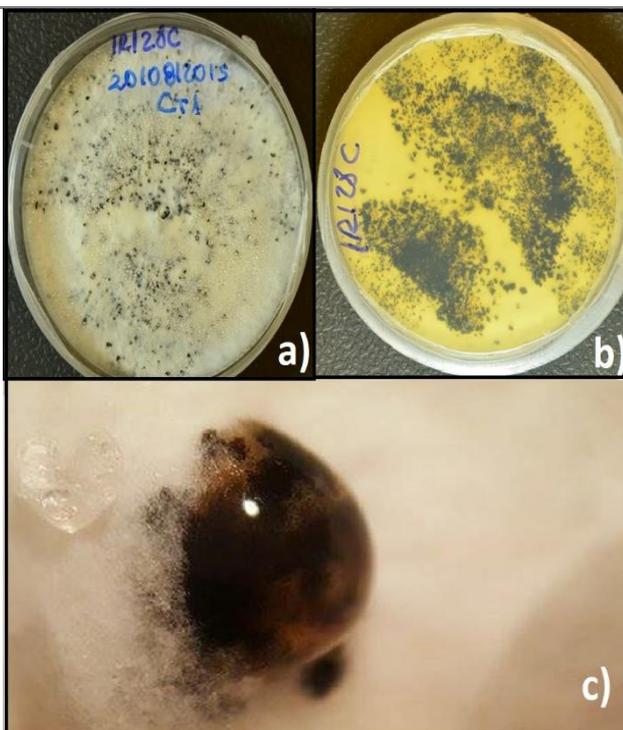
Fuente y Elaboración: Autor

**Tabla 7.** *Lentinus* sp. BC009 (HUTPL364) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS	
<p><b>c)</b> Hifas hialinas, con presencia de clamps, su pared es delgada (Figura 9 c).</p>	 <p>A microscopic image showing several long, thin, pinkish-purple hyphae. The hyphae are interconnected and feature distinct clamps (constrictions) at various points. The background is a light, slightly grainy grey. The label 'c)' is in the bottom right corner.</p>

Fuente y Elaboración: Autor

**Tabla 8.** *Pestalotiopsis* sp. IR128C (HUTPL83) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS	
<p><b>A)</b> El micelio presenta un crecimiento rápido de color blanco, su forma es algodonosa, se expande en toda la caja (50 mm), pasada una semana (Figura 10 a).</p> <p><b>B)</b> Picnidio, coloración oscura que contiene esporas (Figura 10 b).</p> <p><b>C)</b> Crecimiento de picnidios en todo el medio (Figura 10 c).</p>	 <p>Three macroscopic images of fungal colonies. Image (a) shows a petri dish with a white, cottony mycelium covering the surface. Image (b) shows a petri dish with a yellowish substrate and a dark, fuzzy colony. Image (c) is a close-up of a dark, spherical structure (picnidium) with a lighter, fuzzy base. The labels 'a)', 'b)', and 'c)' are in the bottom right of each respective image.</p>

Fuente y Elaboración: Autor

**Tabla 9.** *Pestalotiopsis* sp. IR128C (HUTPL83) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

## DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS

**D)** Se aprecian los conidios que posee cuatro septas hialinas, tres apéndices apicales y un basal ambos hialinos (Labarca, Sanabria, & Arcia, 2006) (Figura 11 d).



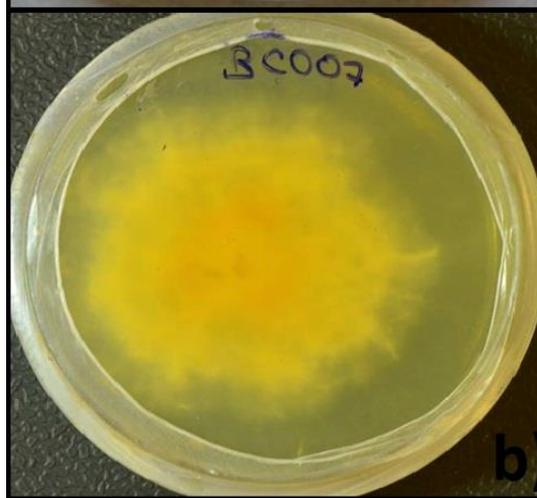
Fuente y Elaboración: Autor

**Tabla 10.** *Pleurotus* sp. BC007 (HUTPL362) y sus características macroscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

## DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS

**a)** En el medio se observan colonias con micelio aéreo blanco-amarillento y largo, su textura es algodonosa, el crecimiento del hongo es forma de anillos concéntricos, después de 72 horas el crecimiento es de 30 mm, y después de 3 a 4 semanas llena la caja Petri (50mm) (Figura 12 a).

**b)** Cambio de tonalidad del medio, ligeramente amarillo y formación en forma de anillo concéntrico (Figura 12 b).



Fuente y Elaboración: Autor

**Tabla 11.** *Pleurotus* sp. BC007 (HUTPL362) y sus características microscópicas en medios de cultivos (Métodos perlita y PDA).

DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS	
<p>c) Presencia de hifas con clamps (Figura 13 c).</p>	

Fuente y Elaboración: Autor

Todas las cepas (Tablas 2 - 11) en ambos métodos tanto en perlita como PDA mantuvieron las características macro y micro morfológicas descritas durante las doce reactivaciones mensuales y con la reactivación anual. Esto es un indicativo de que las características de cada cepa estudiada no fueron modificadas, lo cual demuestra que los protocolos aplicados son eficaces en la mantención de pureza de las cepas de estudio. No obstante, en ciertos estudios, se ha reportado que algunos hongos sometidos a replicaciones continuas modifican fuertemente sus características (Butt, Wang, Shah, & Hall, 2006) .

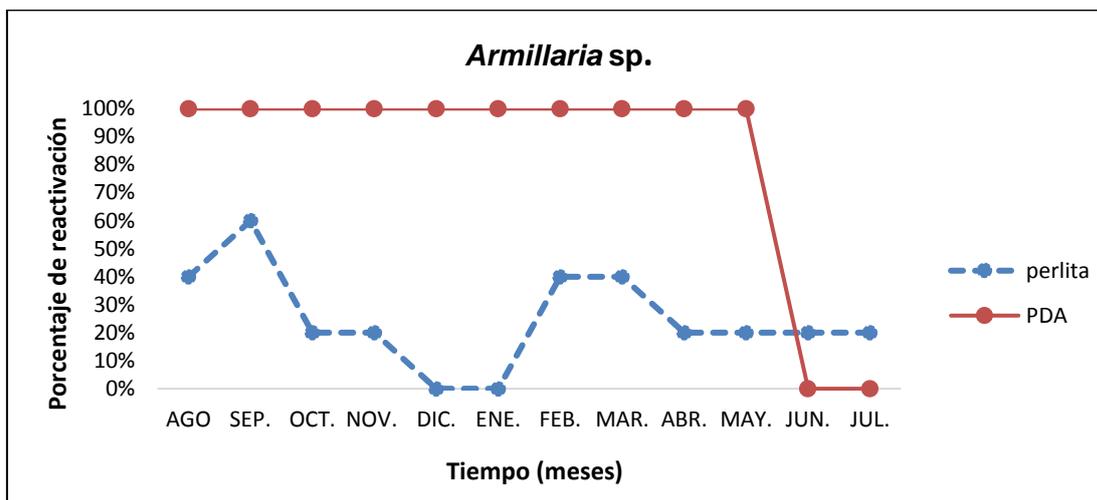
Al realizar replicaciones continuas se presentó el inconveniente de contaminación con otras cepas de rápido crecimiento como por ejemplo levaduras, que son muy típicas de manipulaciones de laboratorio como se menciona en algunos estudios (García & Uruburu, 2000).

### **3.2. Efecto de la criopreservación de cada cepa estudiada. Comparación entre Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y Protocolo medio PDA, reactivación mensual (12 meses).**

La viabilidad de todas las cepas en cada reactivación presentó ligeras variaciones que se detallaran a continuación según cada cepa.

La evaluación de reactivación de crecimiento micelial durante los doce meses (se tomó perlita del mismo criovial durante los 12 meses de reactivación), la cepa *Armillaria* sp., en el método perlita presentó una frecuencia de reactivación discontinua, donde la cepa no se reactiva en dos meses (quinto y sexto mes), esto pudo deberse a cuestiones del azar, que la cepa no se encuentra en todas las perlitas. Luego en el

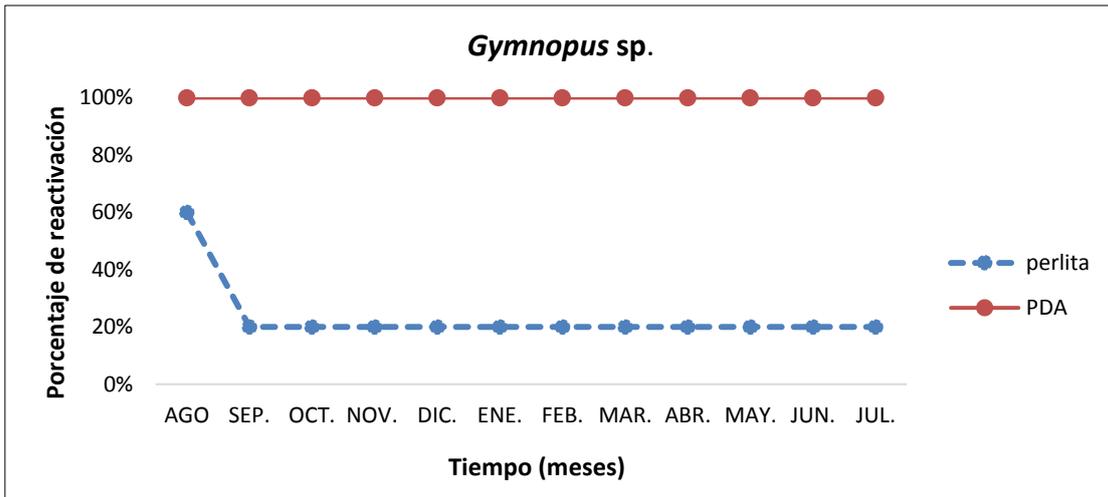
séptimo mes se reactiva nuevamente la cepa, pero con una tasa baja (aprox. 40%) según el número total de replicas realizadas (5 réplicas), teniendo en cuenta que, de cada criovial se toma una perlita para ser inoculada en medio PDA. Por otra parte la cepa de *Armillaria sp.*, en el método PDA se reactivó al 100% (5 réplicas) durante los diez meses, pero se detuvo el crecimiento del hongo en el onceavo y doceavo mes (Figura 4).



**Figura 4.** Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa *Armillaria sp.*, en método perlita y PDA.

**Fuente y Elaboración:** Autor

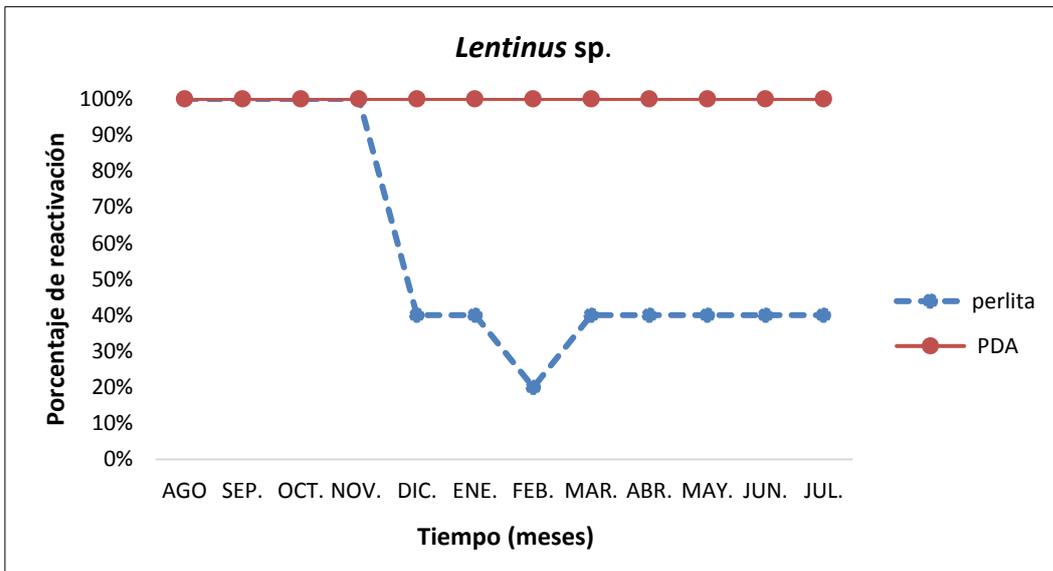
La cepa *Gymnopus sp.*, en el método perlita se reactivó durante los 12 meses de evaluación, pero con el indicativo que desde el segundo mes de reactivación solo fue el 20% de las 5 réplicas hasta el doceavo mes. En cambio que la cepa *Gymnopus sp.*, en el método PDA mostró un 100% de reactivación durante los 12 meses (Figura 5).



**Figura 5.** Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa *Gymnopus sp.*, en método perlita y PDA.

**Fuente y Elaboración:** Autor

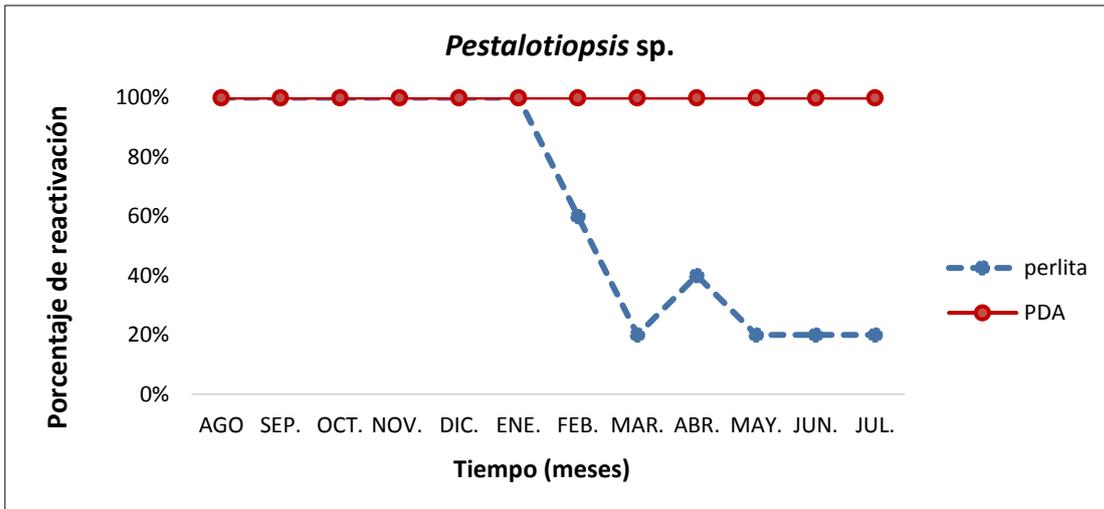
La cepa *Lentinus sp.*, en el método perlita se reactivó durante los 12 meses de evaluación, pero con el indicativo que desde el quinto mes de reactivación solo fue el 40% de las 5 réplicas hasta el doceavo mes. En cambio la cepa *Lentinus sp.*, en el método PDA mostro un 100% de reactivación durante los 12 meses (Figura 6).



**Figura 6.** Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa *Lentinus sp.*, en método perlita y PDA.

**Fuente y Elaboración:** Autor

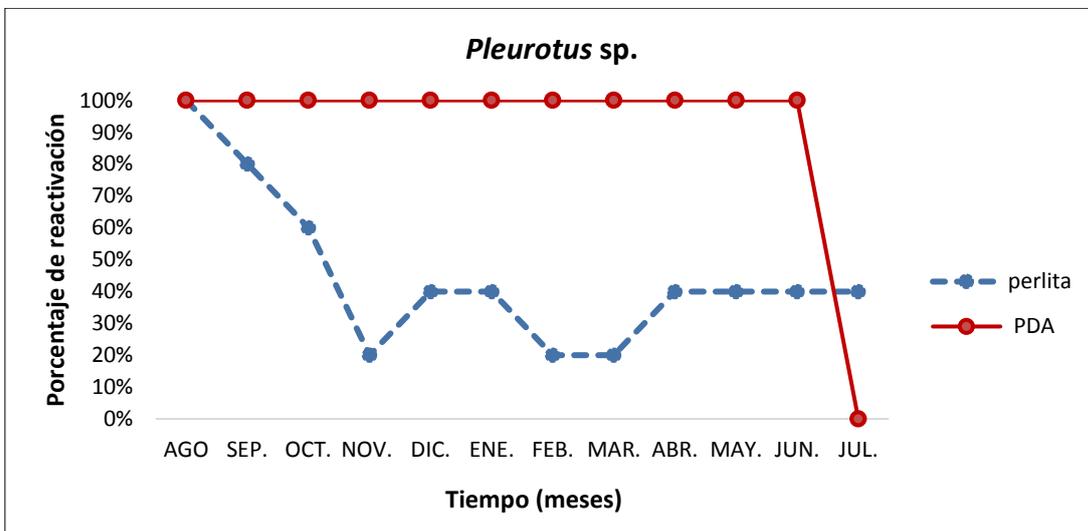
La cepa *Pestalotiopsis sp.*, en el método perlita se reactivó durante los 12 meses de evaluación, pero con el indicativo que desde el sexto mes de reactivación solo fue el 20% de las 5 réplicas hasta el doceavo mes. En cambio *Pestalotiopsis sp.*, en el método PDA obtuvo un 100% de reactivación durante los 12 meses (Figura 7).



**Figura 7.** Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa *Pestalotiopsis sp.*, en método perlita y PDA.

**Fuente y Elaboración:** Autor

La cepa *Pleurotus sp.*, en el método perlita se reactivó durante los 12 meses de evaluación, pero con el indicativo que desde el segundo mes de reactivación solo fue 40% de las 5 réplicas hasta el doceavo mes. Por otra parte la cepa *Pleurotus sp.*, en el método PDA se reactivó al 100% (5 réplicas) durante los once meses, pero se detuvo el crecimiento del hongo en el onceavo mes (Figura 8).



**Figura 8.** Gráfico de líneas. Relación entre tiempo y porcentaje de reactivación, de la cepa *Pleurotus sp.*, en método perlita y PDA.

**Fuente y Elaboración:** Autor

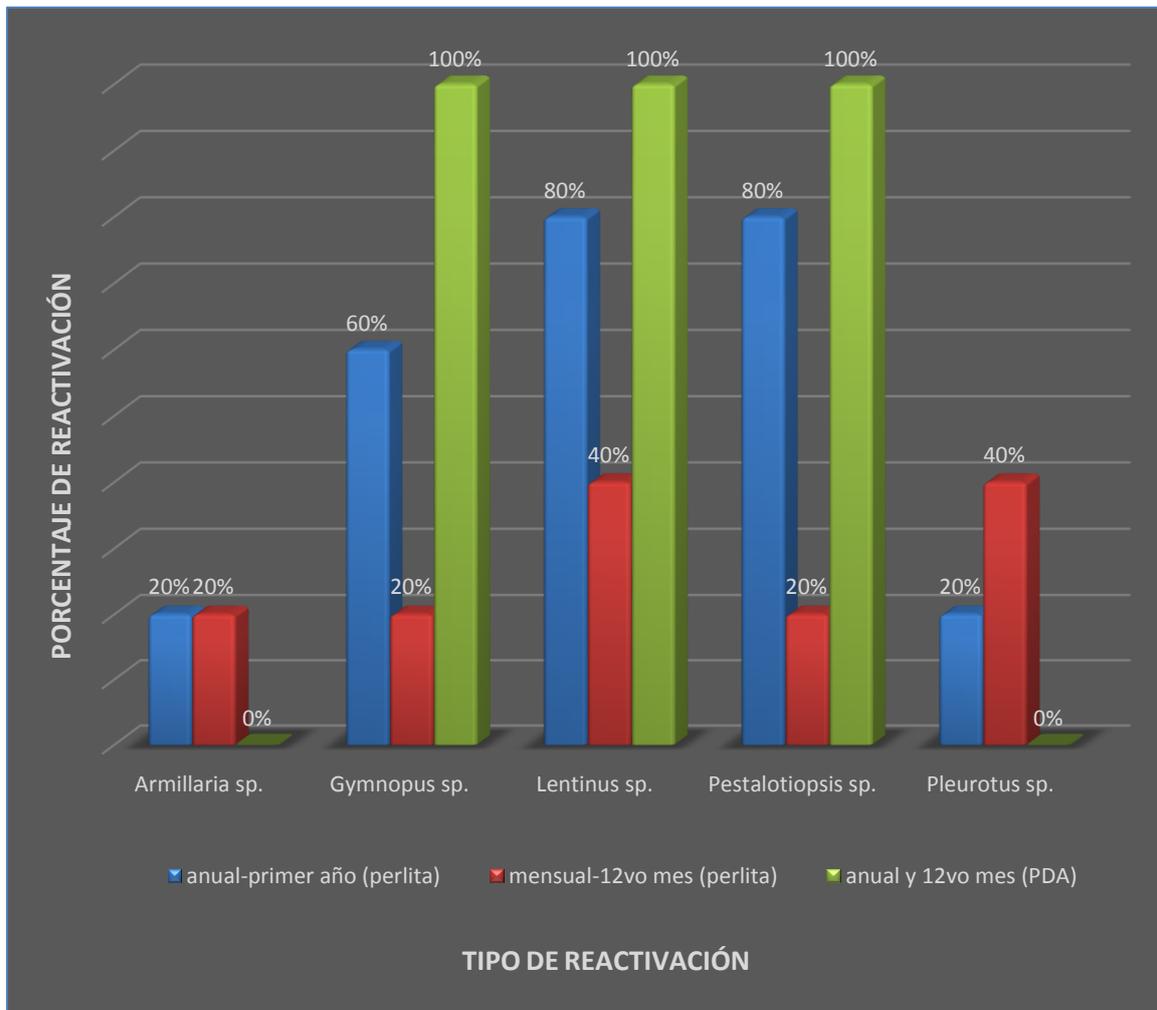
Las reactivaciones mensuales (Figuras 4 - 8) nos permiten observar que ambos métodos presentan aumento y disminución de tasas de reactivación en el transcurso del tiempo. Al observar la secuencia de reactivaciones de todas las cepas se deduce que el método perlita al contener granos del mineral va a ser probablemente

dependiente de que el hongo haya colonizado o no la perlita, por lo que en ciertos meses como por ejemplo *Armillaria* sp., no se reactiva dos meses seguidos, para posteriormente reactivarse normalmente. Por el lado contrario, el método PDA muestra una secuencia continua de reactivación del hongo probablemente a que el hongo crece más uniformemente sobre la superficie del medio PDA y más bien perdemos viabilidad en los últimos meses donde probablemente se va terminando espacios de medio más hongo como ya se indica en Perez (2006), que ciertos hongos en medio sólido crecen de forma lineal y no exponencial.

### **3.3. Efecto de la criopreservación en cepas estudiadas. Comparación entre Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y Protocolo medio PDA, en una reactivación anual y la última reactivación mensual (12<sup>vo</sup> mes).**

El método perlita, tanto para el doceavo mes de la reactivación mensual (reactivaciones continuas), como para la reactivación anual, permitió la recuperación de las 5 cepas *Armillaria* sp., *Gymnopus* sp., *Lentinus* sp., *Pestalotiopsis* sp., y *Pleurotus* sp., con diferentes variaciones en sus porcentajes (Figura 9) acorde al número de réplicas evaluadas (5 réplicas). Todas las cepas en estudio conservaron sus características macro y micro morfológicas, así como su pureza en los dos tipos de reactivaciones (mensual y anual).

Por otra parte, el método PDA, presento datos coincidencialmente iguales tanto para el doceavo mes de la reactivación mensual como para la reactivación anual por lo que se utilizó solo una barra representativa para todas las especies (Figura 9). En este método se presentó un 0% de reactivación para las cepas *Armillaria* sp., y *Pleurotus* sp., en el doceavo mes.



**Figura 9.** Grafica de barras comparación de tipo y porcentaje de reactivación (mensual-doceavo mes y anual-primer año) de cinco especies fúngicas método perlita y PDA.

**Fuente y Elaboración:** Autor

En la Figura 9 comparamos la efectividad de los métodos perlita y PDA tras realizar dos tipos de reactivación uno al año (anual), y otro en reactivaciones continuas (tomando perlitas de un único criovial) durante 12 meses (mensual), para saber si se ve afectada o no la viabilidad (recuperación de las cepas). En el método perlita los porcentajes de reactivación en el grupo anual (un año) de las cepas *Pestalotiopsis sp.*, presenta un porcentaje mayor con un 75%, la cepa *Gymnopus sp.*, un 66.6 % y *Lentinus sp.* un 50%, que en la última reactivación mensual. Mientras que la cepa *Armillaria sp.*, muestra un porcentaje igual 20% en ambos grupos. Un caso diferente a lo mencionado es la cepa *Pleurotus sp.*, quien presenta un porcentaje mayor con un 50% en la reactivación mensual (12<sup>vo</sup> mes), que la reactivación anual (1 año).

Este efecto de reactivación o no reactivación probablemente, tenga una explicación en que la perlita es un mineral granulado que puede ser colonizado o no por el micelio fúngico y al ser tomadas al azar los segmentos hay una probabilidad de 50% de tomar

o no la perlita colonizada por la cepa del hongo (Sato et al., 2012). Adicionalmente a esta explicación, a lo mejor todas las cepas están reaccionando diferentemente al proceso de congelación debido a que se congelan directamente de temperaturas mayores a menores y no se efectúa un enfriamiento gradual (de 1°C/ min a -80°C) como ya es explicado por Homolka (2007).

Los datos para el método PDA (Figura 9) tanto la reactivación anual, como en la última reactivación mensual, se obtuvo la recuperación de tres cepas *Gymnopus* sp., *Lentinus* sp., y *Pestalotiopsis* sp., mientras que las especies *Armillaria* sp., y *Pleurotus* sp., no fueron aptas para mantenerse durante un año en PDA. Según Rodríguez-Macias, (1996) se tiene conocimiento que el género *Pleurotus* es sensible a variaciones de temperatura, además el género *Armillaria* resiste a un frío moderado (Tamayo, 2007), esto pudo ser una causa por la cual no resistieron la criopreservación durante un año.

Este dato de muerte de dos cepas y supervivencia de otras en el método Protocolo medio PDA el cual carece de un agente crioprotector a diferencia que el Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado, sugiere que todo organismo cepa o especie reacciona diferente a las condiciones adversas que se le presente. Las cepas que resistieron a la criopreservación fueron *Gymnopus* sp, *Lentinus* sp., y *Pestalotiopsis* sp., sugiriendo que son resistentes a temperaturas bajas, lo cual es confirmado por el crecimiento de estos géneros *Gymnopus* (Castilla et al., 2008), *Lentinus* (J. García, 2014), y *Pestalotiopsis* (Venedikian, Bonaventura, & Godeas, 2001), a temperaturas bajas.

Algunos estudios demuestran que ciertos hongos basidiomicetos (p. ej. *Lentinus edodes*) presentan sustancias anticongelantes, entre las cuales se encuentran proteínas y glicoproteínas que pueden estar confiriendo esta supervivencia (Palacio, Gutiérrez, Rojas, Atehortúa, & Zapata, 2014).

Es conocido también que varios hongos consumen la sacarosa y glucosa que pueden constituirse en agentes crioprotectores semipermeables concentrados en la membrana plasmática y la pared celular de los hongos. Evitando tanto la formación de hielo como las lesiones criogénicas y favoreciendo la recuperación del crecimiento micelial después de disminución de temperaturas (Mantovani et al., 2012).

#### **3.4. Test de chi- cuadrado en evaluación de datos.**

Con el fin de evaluar estadísticamente los datos de reactivación tomados de los métodos perlita y PDA, se aplicó la prueba no paramétrica chi- cuadrado ( $X^2$ ) para la

evaluación de la asociación entre los tipos de reactivación y el método evaluado, obteniendo los siguientes datos.

**Tabla 12.** Relación entre reactivación anual (1 año) y mensual (12<sup>vo</sup> mes) de método perlita de las cinco cepas fúngicas.

Cepas	Método	Grupo 1	Grupo 2
		(12vo mes) mensual	(1 año) anual
<i>Armillaria sp.</i> HUTPL372	perlita	20%	20%
<i>Gymnopus sp.</i> HUTPL48	perlita	20%	60%
<i>Lentinus sp.</i> HUTPL364	perlita	40%	80%
<i>Pestalotiopsis sp.</i> HUTPL83	perlita	20%	80%
<i>Pleurotus sp.</i> HUTPL362	perlita	40%	20%

**\*\* No significación estadística: chi- cuadrado; p= 0,1489\*\***

Fuente y Elaboración: Autor

En el grupo 1 (mensual) se realizaron reactivaciones mensuales del mismo criovial (continuas) durante 12 meses de aquí se tomaron los datos del último mes para realizar la comparación con el grupo 2 (anual), del cual se hizo una sola reactivación al año. Para las cinco cepas fúngicas estudiadas no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,1489$ ) entre los grupos anual y mensual del método perlita.

**Tabla 13.** Relación entre reactivación anual (1 año) y mensual (12<sup>vo</sup> mes) de método PDA de las cinco cepas fúngicas.

Cepas	Método	Grupo 1	Grupo 2
		(12vo mes) mensual	(1 año) anual
<i>Armillaria sp.</i> HUTPL372	PDA	0%	0%
<i>Gymnopus sp.</i> HUTPL48	PDA	100%	100%
<i>Lentinus sp.</i> HUTPL364	PDA	100%	100%
<i>Pestalotiopsis sp.</i> HUTPL83	PDA	100%	100%
<i>Pleurotus sp.</i> HUTPL362	PDA	0%	0%

**\*\* No significación estadística: chi- cuadrado; p= 0,7728\*\***

Fuente y Elaboración: Autor

En el grupo 1 (mensual) se realizaron reactivaciones mensuales del mismo criovial (continuas) durante 12 meses de aquí se tomaron los datos del último mes para realizar la comparación con el grupo 2 (anual), del cual se hizo una sola reactivación al año. Para las cinco cepas fúngicas estudiadas no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,7728$ ) entre los grupos anual y mensual del método PDA.

Al realizar reactivaciones sucesivas se genera estrés osmótico, lo cual causa daños en la célula, por ello se trató de comparar la influencia que se tiene en la viabilidad, al realizar cada mes reactivaciones sucesivas (Martínez-Villarreal, Garza-Romero, Moreno-Medina, Hernández-Delgado, & Mayek-Pérez, 2016). Se comprobó que no es significativa la diferencia entre el grupo 1 y 2, obteniendo las cepas en ambos casos en el método perlita.

En el método PDA no se reactivaron dos cepas *Armillaria* sp., y *Pleurotus* sp., tanto en la reactivación anual como mensual. El método perlita en el momento de reactivar muestra una distribución al azar, de selección del mineral colonizado, y muchas veces puede ser que seleccionemos justamente la perlita que no está colonizada, reduciendo así la tasa de reactivación (Sato et al., 2012). Este método muestra que el hongo algunas veces es incapaz de llegar a todo el sustrato (propia observación).

**Tabla 14.** Relación entre método perlita y PDA en una reactivación anual de cinco cepas fúngicas.

<b>Cepas</b>	<b>Método</b>	<b>Grupo 2 (1 año) anual</b>
<b><i>Armillaria</i> sp.</b> HUTPL372	perlita	20%
	PDA	0%
<b><i>Gymnopus</i> sp.</b> HUTPL48	perlita	60%
	PDA	100%
<b><i>Lentinus</i> sp.</b> HUTPL364	perlita	80%
	PDA	100%
<b><i>Pestalotiopsis</i> sp.</b> HUTPL83	perlita	80%
	PDA	100%
<b><i>Pleurotus</i> sp.</b> HUTPL362	perlita	20%
	PDA	0%

**\*\* No significación estadística: chi- cuadrado;  $p= 0,7757$ \*\***

**Fuente y Elaboración:** Autor

Para las cinco cepas fúngicas estudiadas no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,7757$ ) que reflejen mayor viabilidad entre el método perlita y PDA en una reactivación anual (grupo 2), por lo cual el tipo de método se asocia al tiempo de reactivación.



Tabla 15. Relación entre método perlita y PDA durante doce meses de reactivación de las cinco cepas fúngicas.

Cepas	Método	PRIMER GRUPO: REACTIVACIÓN MENSUAL CONTINUA												Chi- cuadrado
		1 <sup>er</sup> mes	2 <sup>do</sup> mes	3 <sup>er</sup> mes	4 <sup>to</sup> mes	5 <sup>to</sup> mes	6 <sup>to</sup> mes	7 <sup>mo</sup> mes	8 <sup>vo</sup> mes	9 <sup>no</sup> mes	10 <sup>mo</sup> mes	11 <sup>vo</sup> mes	12 <sup>vo</sup> mes	
<b><i>Armillaria sp.</i></b> HUTPL372	PDA	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	4.689e-10*
	perlita	40%	60%	20%	20%	0%	0%	40%	40%	20%	20%	20%	20%	
<b><i>Gymnopus sp.</i></b> HUTPL48	PDA	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	< 2.2e-16*
	perlita	60%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	
<b><i>Lentinus sp.</i></b> HUTPL 364	PDA	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	6.863e-08*
	perlita	100%	100%	100%	100%	40%	40%	20%	40%	40%	40%	40%	40%	
<b><i>Pestalotiopsis sp.</i></b> HUTPL83	PDA	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	1.548e-06*
	perlita	100%	100%	100%	100%	100%	100%	60%	20%	40%	20%	20%	20%	
<b><i>Pleurotus sp.</i></b> HUTPL362	PDA	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	1.167e-07*
	perlita	100%	80%	60%	20%	40%	40%	20%	20%	40%	40%	40%	40%	

\*Significación estadística: chi- cuadrado.

Fuente y Elaboración: Autor

Como se puede observar en la (Tabla 15), existe una diferencia significativa en la reactivación de todas las cepas fúngicas entre los dos métodos de criopreservación cuando estos se comparan dentro de la misma cepa, por lo cual concluimos que el porcentaje de reactivación está relacionado con el tipo de método.

Así tenemos que las cepas *Armillaria* sp., y *Pleurotus* sp., no se reactivan en el método PDA al culminar el año de almacenaje a diferencia de *Lentinus* sp., *Gymnopus* sp., y *Pestalotiopsis* sp., debido a, que al ser diferentes especies, la capacidad metabólica de reacción frente a ambientes extremos como la disminución de la temperatura es distinto (Margesin, Schinner, Marx, & Gerday, 2007).

Por otra parte, en el método PDA, el hongo crece uniformemente sobre la superficie, con lo cual tendremos un mayor porcentaje de probabilidad que en la reactivación de este se tenga éxito en seleccionar micelio para verificación de crecimiento. Hay varios estudios que demuestran que los hongos se acoplan y crecen según la superficie del sustrato (Perez, 2006; Sato et al., 2012) así como ya se menciona anteriormente. Además el medio PDA en comparación con otros medios tiene una influencia en la temperatura, pH y crecimiento del hongo, lo cual contribuyo a la resistencia del hongo (Luque, 1989). Por esto puede verse tanto en la reactivación anual como mensual, transcurrido cierto tiempo se detiene el crecimiento de ciertos hongos.

## CONCLUSIONES

Las cepas que se utilizaron en este estudio mostraron en el método PDA resistencia a temperaturas bajas (-80°C), cuya viabilidad dependió, de la resistencia propia de cada especie en relación al tiempo y al medio.

Las cepas en estudio conservaron su estabilidad macro y micro morfológica resistiendo en ambos métodos de criopreservación a -80°C.

El método Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado, muestra la recuperación de las cinco especies, por lo tanto, muestra mayor eficacia para conservar las cinco cepas estudiadas, diferente al método PDA que muestra pérdida de viabilidad de las cepas durante el año de reactivaciones.

La reactivación de tres cepas (*Gymnopus* sp., *Lentinus* sp., y *Pestalotiopsis* sp.) en el método PDA sin crioprotectores son un indicativo que cada especie responde metabólicamente distinto a diferentes ambientes y probablemente produzcan crioprotectantes.

## RECOMENDACIONES

Evaluación diaria de temperatura del congelador, controlar las fechas de reactivación para tener disponibilidad de materiales y medio, para que no se afecte el estudio de las cepas. Por si sucede alguna avería del congelador tener disponibilidad de otro equipo.

Sería conveniente una caracterización molecular como garantía de la pureza de las cepas y si hay variaciones en el genoma de las cepas fúngicas en estudio.

El análisis de ambos métodos Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA, muestran diferente eficacia en la conservación de las cinco especies, por lo que, para estudios posteriores en otras cepas se recomienda monitoreo constante de la viabilidad, por la resistencia que mostró poseer cada cepa al ser sometida a -80°C.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alarcon, D. (2006). *Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad javeriana (tesis de pregrado)*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Carrera De Microbiología Industrial. Colombia.
- Alexopoulos, C. J., & Mims, C. W. (1985). *Introducción a la micología*. (Omega, Ed.). Barcelona.
- Ayala, L. (2015). *Estudios en degradación de poliuretano con hongos endófitos del género Pestalotiopsis (tesis de pregrado)*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Beltrán, Y., Morris, H. J., de la Cruz, E. R., Quevedo, Y., & Bermúdez, R. C. (2013). Contenido de fenoles totales en *Pleurotus* sp. extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 32(2), 121-129. Recuperado a partir de <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84884148370&partnerID=40&md5=4e27ceb4cc02d23c6a43f6449e63138a>
- Boa, E. (2005). *Productos Forestales no Madereros, N° 17. Los hongos silvestres comestibles: perspectiva global de su uso e importancia para la población*. FAO. Roma.
- Bon, M. (2005). *Guía de campo de los hongos de España y Europa* (Omega S.A.). Barcelona.
- Burdsall, H., & Dorworth, E. (1994). Preservar las culturas de Basidiomicetos que descomponen la madera usando agua destilada esterilizada en crioviales. *Revista de Micología*, 86(2), 257-280. <https://doi.org/10.2307/3760650>
- Butt, T. M., Wang, C., Shah, F. A., & Hall, R. (2006). *Degeneración de hongos entomógenos. pag. 213-226. En: J. Eilenberg y H.M.T. Hokkanen (eds), un enfoque ecológico y social para el control biológico*. Amsterdam: Springer Netherlands.

- Cabral, E., Sobrado, S., & Romero, F. (2013). *Hongos. Diversidad Vegetal* (Diversidad).
- Carmichael, J. W. (1956). Almacenamiento congelado para Stock de Culturas de Hongos. *Revista de Micología*, 48(3), 378-381. Recuperado a partir de <http://www.jstor.org/stable/3755355>
- Carmichael, J. W. (1962). Viabilidad de las culturas de moho almacenado a: 20 ° C. *Revista de Micología*, 54(4), 432-436. Recuperado a partir de <http://www.jstor.org/stable/3756573>
- Castilla, F., de la Cruz, R., Olmedo, S., Álvarez, J., Baeza, R., Cabrero, E., ... Villanueva, L. (2008). *nº 3 Hongos del Arbolito*. Madrid: Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio. Recuperado a partir de [www.madrid.org](http://www.madrid.org)
- Chaverri, P. (2010). *Microfungi común de Costa Rica y otras regiones tropicales* (INBio).
- Fernández, C., Díaz, L., Zaragoza, M., Aragonés, C., Martínez, G., & Perurena, M. (2012). Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de Histoplasma y Cryptococcus. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64(1), 49-54.
- García, J. (2014). *Optimización de la metodología para la producción de hongos comestibles (tesis de pregrado)*. Universidad del País Vasco. Leioa.
- García, M. D., & Uruburu, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*, 30(1), 12-16. Recuperado a partir de [https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM30\\_12.pdf](https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM30_12.pdf)
- Gato, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de Trichoderma harzianum Rifai. *Revista Fitosanidad*, 14(3), 189-195.
- González, R., & Abad, J. (1976). Armillaria Mellea Quel. *Revista Forestal de Perú*, 6(1-2), 1-7.
- Gupta, R., Kumar, S., Gomes, J., & Kuhad, R. C. (2012). Estudio cinético de la sacarificación enzimática discontinua y en lotes alimentados del sustrato pretratado y posterior fermentación a etanol. *Bioteología para biocombustibles*, 5(1), 16. Recuperado a partir de [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369211/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369211/)

- Hawksworth, D. L. (2001). La magnitud de la diversidad fúngica: la estimación de 1,5 millones de especies revisitada. *Investigación micológica*, 105(12), 1422-1432. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... Zhang, N. (2007). Una clasificación filogenética de alto nivel de los hongos. *Investigación micológica*, 111(5), 509-547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Homolka, L., Lisá, L., Eichlerová, I., & Nerud, F. (2001). Criopreservación de cepas de basidiomicetos usando perlita. *Revista de métodos microbiológicos*, 47(3), 307-313. Recuperado a partir de [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00338-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00338-4)
- Homolka, L., Lisá, L., Kubátová, A., Váňová, M., Janderová, B., & F., N. (2007). Crioconservación de micromicetos filamentosos y levaduras usando perlita. *Microbiologica*, 52, 153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02932154>
- Homolka, L., Lisá, L., & Nerud, F. (2006). Criopreservación basidiomicete en perlita: evaluación de un nuevo método. *Criobiología*, 52(3), 446-453. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.02.003>
- Humber, R. A. (1994). Consideraciones especiales para operar una colección de cultura de patógenos fúngicos exigentes. *Revista de Microbiología Industrial*, 13(3), 195–196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01584009>
- Humber, R. A. (2012). Preservación de cultivos de hongos entomopatógenos. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual de Técnicas en Patología Invertebrada* (Academic P, p. 484).
- Hwang, S. (1968). Investigación de temperatura ultrabaja para cultivos fúngicos. I. Una evaluación del almacenamiento de nitrógeno líquido para la preservación de cultivos fúngicos seleccionados. *Revista de Micología*, 60(3), 613-621. Recuperado a partir de <http://www.jstor.org/stable/3757428>
- Ihaka, R. (1998). R: Historia pasada y futura. *Proceedings of the 30th Symposium on the Interface*, 392–396. Recuperado a partir de <http://cran.r-project.org/doc/html/interface98-paper/paper.html>
- Jang, S., Jang, Y., Lim, Y. W., Kim, C., Ahn, B. J., Lee, S.-S., & Kim, J.-J. (2016). Identificación filogenética de *Gymnopus* spp. y el primer informe de 3 especies: *G.*

- iocephalus, *G. polygrammus* y *G. subnudus*. *Revista de Micología*, 44(3), 131-136.
- Jensen, W., & Salisbury, F. (1988). *Botánica. 2a Edición* (McGraw-Hil). México.
- Johnson, G. C., & Martin, A. K. (1992). Supervivencia de hongos que viven en la madera almacenados durante 10 años en el agua y bajo aceite. *Revista de Microbiología*, 38(8), 861-864. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1139/m92-140>
- Jong, S. C., & Davis, E. E. (1987). Preservación de germoplasma de hongo comestible en cultivo mediante almacenamiento criogénico. *Desarrollos en Ciencia de Cultivos*, 10, 213-225. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-42747-2.50028-2>
- Juarros, E., Tortajada, C., García, M., & Uruburu, F. (1993). Almacenamiento de cultivos de hongos filamentosos a -80 ° C: efectos de diferentes métodos de congelación-descongelación. *Revista de Microbiología*, 91(1), 28. Recuperado a partir de [europepmc.org/abstract/med/8397963](http://europepmc.org/abstract/med/8397963)
- Kathiravan, G., & Sri Raman, V. (2010). Producción de TAXOL in vitro, por *Pestalotiopsis breviseta*, primer informe. *Fitoterapia*, 81(6), 557-564. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.01.021>
- Kleiber, C., & Zeileis, A. (2008). Use R. Econometría Aplicada con R. En *Springer* (pp. 1-221). <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77318-6>
- Labarca, M., Sanabria, N., & Arcia, A. (2006). Patogenicidad de *Pestalotiopsis palmarum* Cooke, sobre plantas de vivero de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(4), 420-428. Recuperado a partir de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182006000400005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182006000400005&lng=es&tlng=es).
- Lee, J. J. (1992). Métodos de preservación de ATCC: congelación y liofilización. *Revista de Protozoología*, 39(5), 651-651. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1992.tb04871.x>
- Lindorf, H., Parisca, L., & Rodríguez, P. (1991). *Botánica, Clasificación, Estructura, Reproducción* (Biblioteca). Venezuela.

- Luque, J. (1989). Efectos de la temperatura, medio de cultivo y pH en el crecimiento colonial de *diploia mutila* fr. apud mont. *Anales Jardín Botánico de Madrid*, 46(1), 215-221.
- Maharachchikumbura, S. N., Guo, L.-D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2011). Pestalotiopsis-morfología, filogenia, bioquímica y diversidad. En *Revista de Micología* (p. 50: 167). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13225-011-0125-x>
- Mantovani, T., Tanaka, H., Umeo, S., Junior, L., do Valle, J., Paccola-Meirelles, L., ... Colauto, N. (2012). Crioconservación a -20 y -70 ° C de *Pleurotus ostreatus* en granos. *Revista de Microbiología India*, 52(3), 484–488. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0289-4>
- Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.-C., & Gerday, C. (2007). *Psicrófilos de la Biodiversidad a la Biotecnología*. Springer Science & Business Media.
- Martínez-Villarreal, R., Garza-Romero, T. S., Moreno-Medina, V. R., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2016). Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico en hongos fitopatógenos: el caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 347-357. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.004>
- Minato, K., Mizuno, M., Terai, H., & Tsuchida, H. (1999). Autólisis de *Lentinan*, un polisacárido antitumoral, durante el almacenamiento de *Lentinus edodes*, hongo Shiitake. *Revista Química agrícola y de alimentos*, 47(4), 1530–1532. <https://doi.org/10.1021/jf981022w>
- Montesinos, R., Ayala, M., & Berlanga, A. (2015). *Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos*.
- Mueller, G. M., Bills, G. F., & Foster, M. S. (2004). *Biodiversidad de Hongos: Inventario y Métodos de Monitoreo*. Boston, MA: Elsevier Academic Press. Recuperado a partir de <http://pubs.er.usgs.gov/publication/5200284>
- Nabors, M. (2006). *Introducción a la Botánica* (Pearson Ed). Madrid.
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W., & Jong, S.-C. (2004). Conservación y distribución de cultivos fúngicos. *Biodiversidad de hongos: métodos de inventario y monitoreo*.

Amsterdam: Elsevier Academic Press, 37-47.

- Palacio, A., Gutiérrez, Y., Rojas, D., Atehortúa, L., & Zapata, P. (2014). Viabilidad de las cepas fúngicas Basidiomycete bajo diferentes métodos de conservación: crioconservación vs. procesos de liofilización. *Actualidades Biológicas*, 36(100), 13-21. Recuperado a partir de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-35842014000100002&lng=en&tlng=en..](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842014000100002&lng=en&tlng=en..)
- Pasarell, L., & McGinnis, M. (1992). Viabilidad de cultivos fúngicos mantenidos a -70°C. *Revista de Microbiología Clínica*, 30(4), 1000-1004.
- Perez, B. (2006). *Descripción de las características macroscópicas, de cultivo in vitro de cepas de Pleurotus aisladas en Guatemala (tesis de pregrado)*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias. Guatemala.
- Piepenbring, M. (2015). *Introducción a la Micología en los Trópicos (The Americ)*. Estados Unidos.
- Pinzón, Y. A., Bustamante, S., & Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). (Spanish). *Revista Colombiana Biotecnológica*, 11(2), 8-18. Recuperado a partir de <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=54370578&lang=es&site=ehost-live>
- Pontón, J., Moragues, M. D., Gené, J., Guarro, J., & Quindós, G. (2002). Hongos y actinomicetos alergénicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 1-45.
- Rico, M., Piattoni, C., González, C., Monela, R., Latoree, M. G., & Lurá, M. C. (2004). Variabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *Revista Fabricib*, 8, 163-172.
- Robinson, C. H. (2001). Adaptación al frío en hongos árticos y antárticos. *New Phytologist*, 151(2), 341-353. Recuperado a partir de [www.kclpure.kcl.ac.uk/portal/en/](http://www.kclpure.kcl.ac.uk/portal/en/)
- Rodríguez-Macias, R. (1996). Caracterización de cepas del hongo comestible *Pleurotus* spp. en medios de cultivo y su evaluación en substratos lignocelulósicos forrajeros para la producción de carpóforos, 5-90.

- Rojas, L. (2013). Reseña Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisorio con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*, 17(1), 49-55.
- Sánchez, C., & Corrales, L. (2005). Congelación bacteriana : Factores que intervienen en el proceso. *Nueva Publicación Científica*, 3, 109-113.
- Sato, M., Sukenobe, J., & Nakagiri, A. (2012). Crioconservación de cultivos basidiomicetos criosensibles mediante la aplicación y modificación del protocolo de perlita. *Cryo-Letters*, 33(2), 86-95.
- Sharma, B., & Smith, D. (1999). Recuperación de hongos después del almacenamiento durante más de un cuarto de siglo. *Revista de Microbiología y Biotecnología*, 15(4), 517-519. <https://doi.org/10.1023/A:1008959521962>
- Singleton, L., Mihail, J., & Rush, C. (1992). *Métodos de investigación en hongos fitopatógenos transmitidos por el suelo* (American P). Minnesota.
- Sutton, B. (1996). *Un siglo de micología*. (Brian Sutton, Ed.). Cambridge University Press.
- Tamayo, P. (2007). Enfermedades del Aguacate. *Politecnica*, (4), 51-70. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.8.2007>
- Venedikian, N., Bonaventura, S. M., & Godeas, A. M. (2001). Estudio de las comunidades fúngicas de la filosfera de pinus taeda l. (pinaceae) l. variacion estacional. *Gayana. Botánica*, 58(2), 143-152. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432001000200006>
- Wasser, S. P. ., & Weis, A. L. (1999). Efectos terapéuticos de las sustancias que se producen en los hongos Basidiomicetos superiores: una perspectiva moderna. *Comentario Crítico<sup>TM</sup> en Inmunología*, 19(1), 32. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmuno.v19.i1.30>
- Zheng, Z., & Shetty, K. (2000). Bioconversión en estado sólido de compuestos fenólicos de orujo de arándano y papel de Lentinus edodes beta-glucosidasa. *Revista Química agrícola y de alimentos*, 48(3), 895-900.

## **ANEXOS**

## **ANEXO 1. Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado.**

### **Materiales:**

- Cepa pura en medio sólido
- Crio-tubos estériles
- Perlit - ¼ PDA + Glicerol al 5% (9.75 g de PDA + 50 ml de Glicerol + 950 ml de agua destilada)
- Cabina de flujo laminar
- Tamiz No: 12 de 1,7 mm

### **Procedimiento:**

1. Tamizar las PERLIT.
2. Llenar los Crio-tubos con 0,20 g de PERLIT.
3. Preparar ¼ PDA + Glicerol al 5%, autoclavar y dejar enfriar.
4. Dispensar 1 ml en los crio-tubos con PERLIT (en cabina de flujo laminar).
5. En cabina de flujo laminar tomamos una pequeña muestra de micelio de 1 mm<sup>2</sup> aproximadamente de la cepa pura e inoculamos en cada tubo previamente preparado y dejamos crecer el micelio durante 1 o 2 semanas (depende de la rapidez del crecimiento micelial de cada hongo) en incubadora a 27°C.
6. Cuando el crecimiento micelial ya sea notorio, llevamos a -4°C durante 24 horas y procedemos a colocar en el congelador a -80°C.

### **Reactivación:**

Colocamos los criviales a 37°C en baño maria.

Con asa redonda se toman perlititas y se inocula en medio de cultivo nuevo y estéril.

## **ANEXO 2. Protocolo medio PDA (Agar Papa Dextrosa)**

### **Materiales:**

- Cepa pura en medio sólido
- Crio-tubos estériles
- 1,5 ml de Medio PDA
- Cabina de flujo laminar

### **Procedimiento:**

1. Llenar los Crio-tubos con 1,5 ml de PDA e inclinar un poco el criovial.
2. Dejar enfriar.
3. En cabina de flujo laminar tomamos una pequeña muestra de micelio de ~2mm<sup>2</sup> aproximadamente de la cepa pura e inoculamos en cada tubo previamente preparado y dejamos crecer el micelio durante 1 o 2 semanas (depende de la rapidez del crecimiento micelial de cada hongo) en incubadora a 27°C.
4. Cuando el crecimiento micelial ya sea notorio, llevamos a -4°C durante 24 horas y procedemos a colocar en el congelador a -80°C.

### **Reactivación:**

Colocamos los crioviales a 37°C en baño maría.

Con un bisturí se toman micelio y se inocula en medio de cultivo nuevo y estéril.

## **ANEXO 3. Porcentaje de contaminación obtenido en Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA, en 12 meses de reactivación mensual.**

**Tabla 16.** Porcentaje de contaminación obtenido en Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA, en 12 meses de reactivación mensual.

CEPAS MESES	<i>Armillaria</i> sp. (372)		<i>Gymnopus</i> sp. (48)		<i>Lentinus</i> sp. (364)		<i>Pestalotiopsis</i> sp. (83)		<i>Pleurotus</i> sp. (362)	
	p*	PDA	p*	PDA	p*	PDA	p*	PDA	p*	PDA
Agosto	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Septiembre	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Octubre	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Noviembre	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Diciembre	0%	0%	0%	0%	0%	0%	60%	0%	0%	0%
Enero	0%	0%	20%	0%	0%	0%	80%	0%	0%	0%
Febrero	0%	0%	0%	0%	0%	0%	60%	0%	0%	0%
Marzo	0%	0%	80%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Abril	0%	0%	0%	0%	0%	0%	80%	0%	0%	0%
Mayo	0%	0%	20%	0%	60%	0%	100%	0%	0%	0%
Junio	0%	0%	20%	0%	60%	0%	100%	0%	0%	0%
Julio	40 %	0%	40%	0%	60%	0%	100%	0%	20 %	0%

p\*=perlita.

**ANEXO 4. Porcentaje de contaminación obtenido en Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA, en una reactivación anual.**

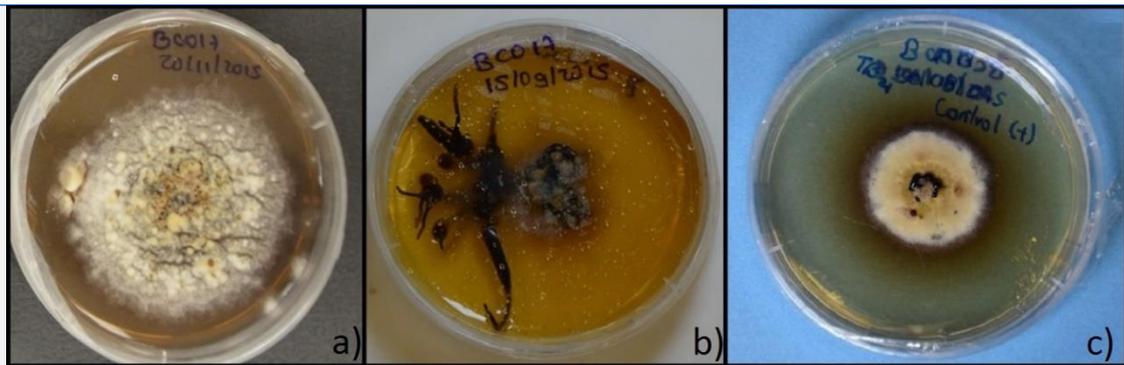
**Tabla 17.** Porcentaje de contaminación obtenido en Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA, en una reactivación anual.

CEPAS MESES	<i>Armillaria</i> sp. (372)		<i>Gymnopus</i> sp. (48)		<i>Lentinus</i> sp. (364)		<i>Pestalotiopsis</i> sp. (83)		<i>Pleurotus</i> sp. (362)	
	p*	PDA	p*	PDA	p*	PDA	p*	PDA	p*	PDA
Julio	0%	0%	0%	0%	%	0%	20%	0%	40%	20%

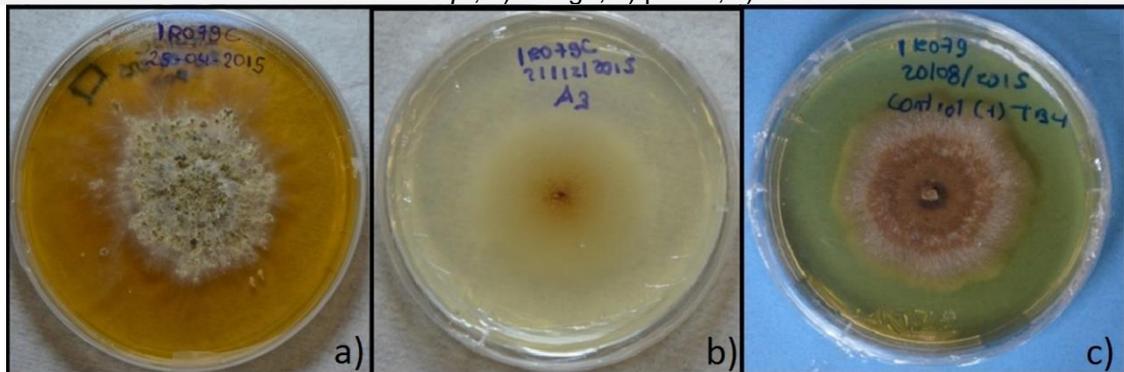
p\*= perlita

**ANEXO 5. Fotos de cepas reactivadas en el primer mes: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA.**

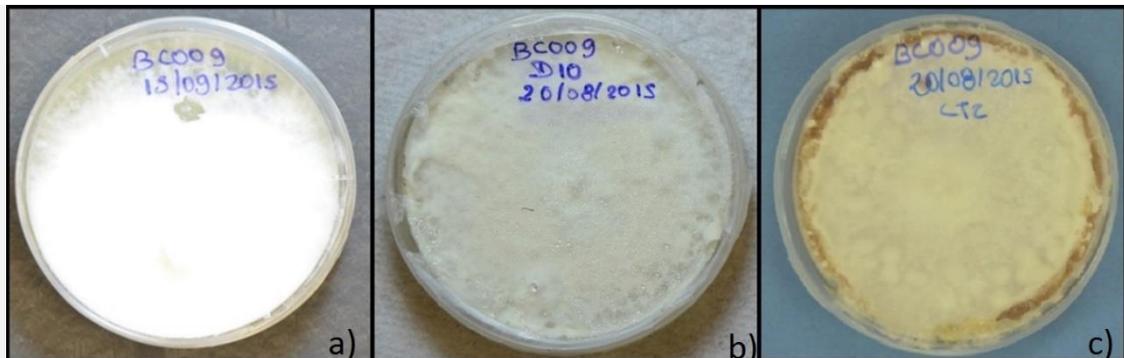
Fotos de cepas reactivadas en el primer mes: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA.



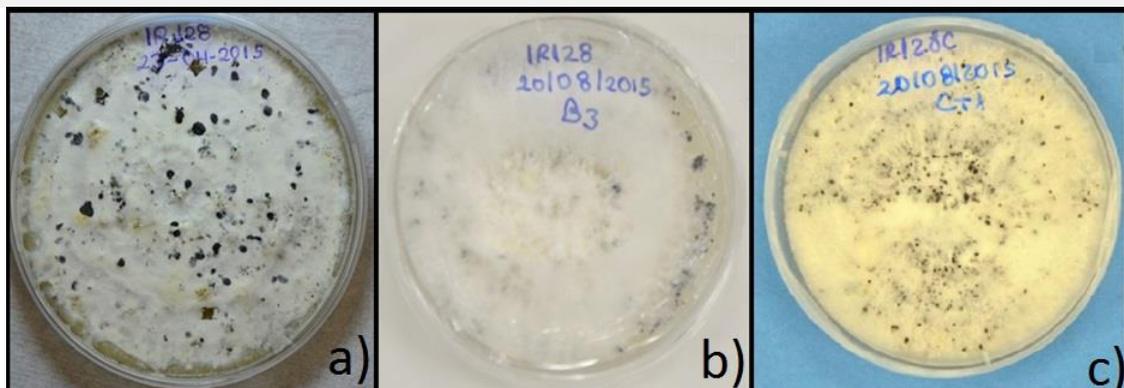
*Armillaria* sp.; a) testigo, b) perlita, c) PDA



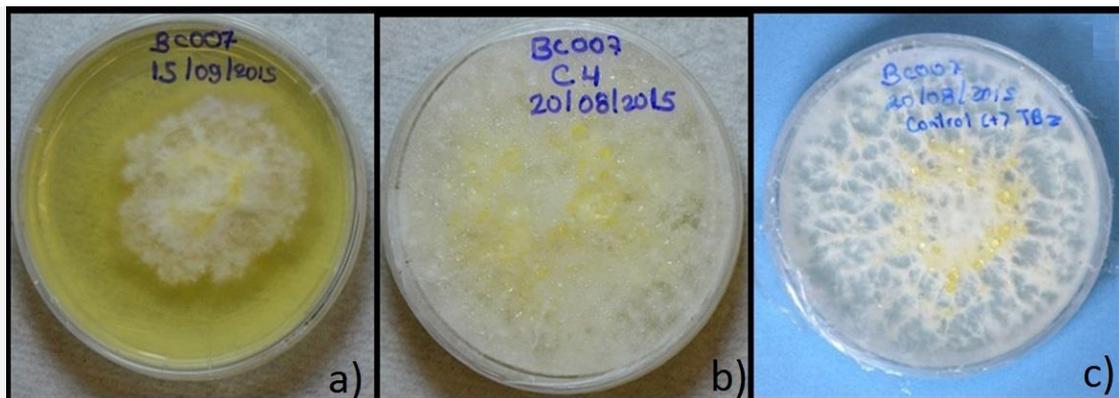
*Gymnopus* sp.; a) testigo, b) perlita, c) PDA.



*Lentinus* sp; a) testigo, b) perlita, c) PDA.



*Pestalotiopsis* sp.; testigo, b) perlita, c) PDA.

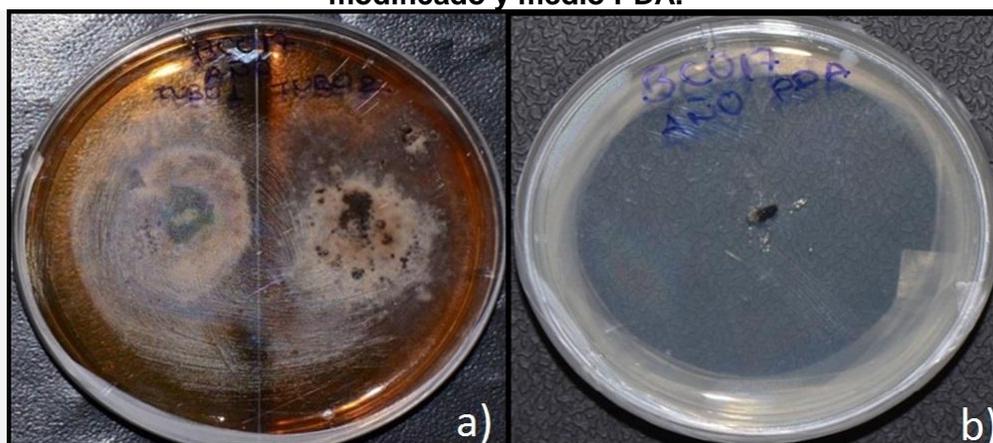


*Pleurotus* sp.; a) testigo, b) perlita, c) PDA.

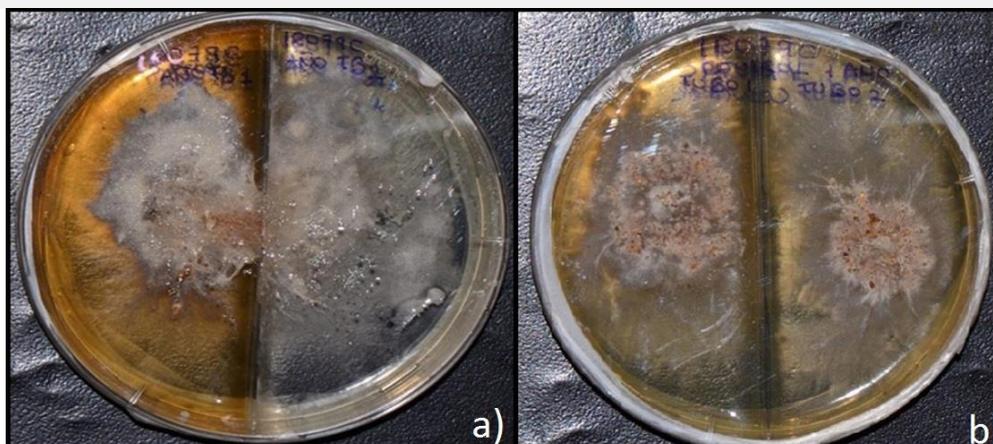
**Figura 10.** Fotos de cepas reactivadas al mes: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA.

**ANEXO 6. Fotos de cepas reactivadas al año: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA.**

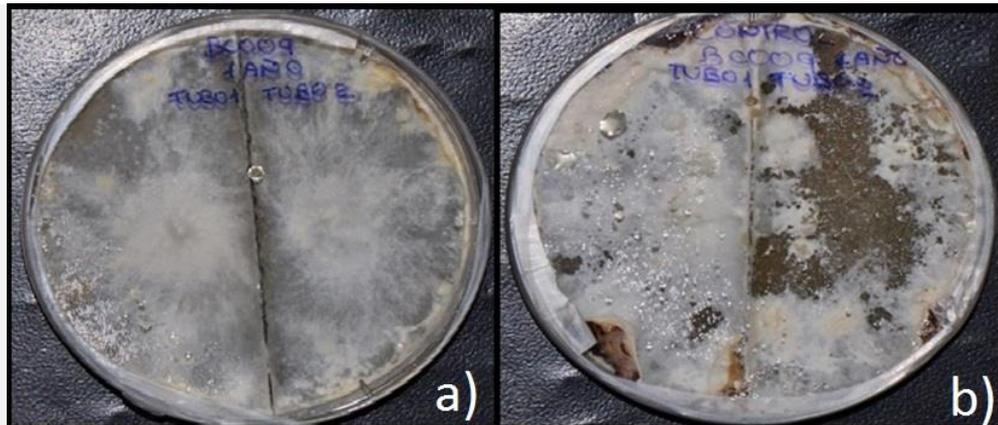
**Fotos de cepas reactivadas al año: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA.**



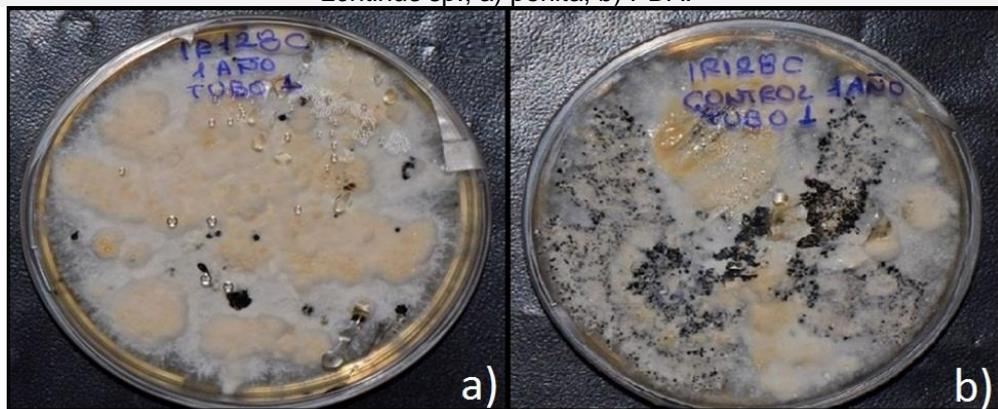
*Armillaria* sp.; a) perlita, b) PDA.



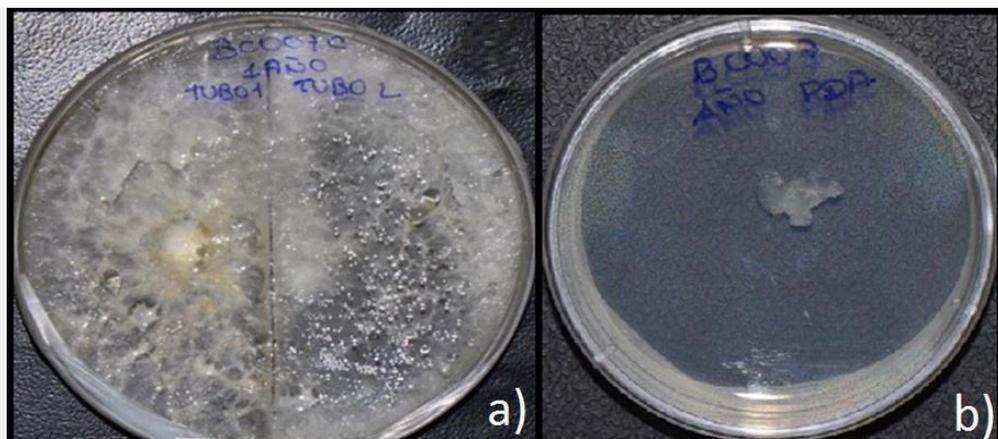
*Gymnopus* sp.; a) perlita, b) PDA.



*Lentinus* sp.; a) perlita, b) PDA.



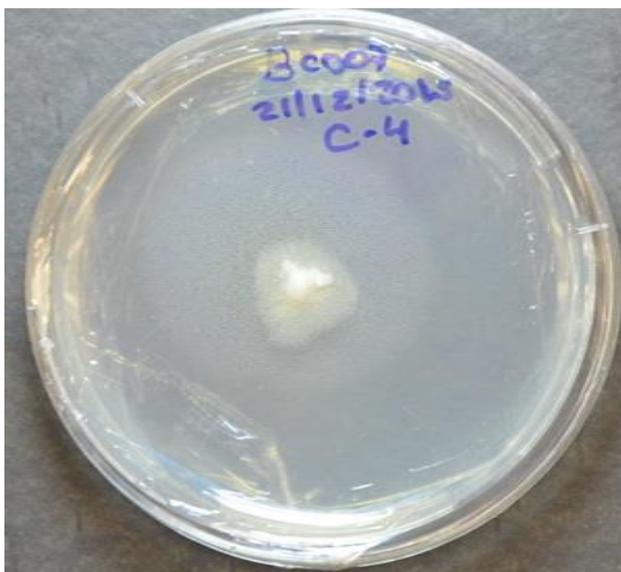
*Pestalotiopsis* sp.; a) perlita, b) PDA.



*Pleurotus* sp.; a) perlita, b) PDA.

**Figura 11.** Fotos de cepas reactivadas al año: Protocolo Homolka Perlita (-80°C) modificado y medio PDA.

**ANEXO 7. Fotos de contaminación en método Perlita**



**Figura 12.** Contaminación por levaduras de medio PDA.