



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Criopreservación a -20°C y -80°C de hongos Ascomycetes en diferentes crioprotectantes.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Cartuche Macas, César Adrián

DIRECTOR: Vivanco Galván, Oscar Amable, BF.

LOJA – ECUADOR

2016



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>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Bioquímico Farmacéutico.

Oscar Amable Vivanco Galván.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Criopreservación a -20°C y -80°C de hongos Ascomycetes en diferentes crioprotectantes”, realizado por el profesional en formación César Adrián Cartuche Macas; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, enero de 2016.

f).....

Oscar Amable Vivanco Galván

1104166556

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, César Adrián Cartuche Macas declaro ser el autor del presente trabajo de titulación: “Criopreservación a -20°C y -80°C de hongos Ascomycetes en diferentes crioprotectantes”, de la titulación de Biólogo siendo el BF. Oscar Amable Vivanco Galván 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.

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 que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

César Adrián Cartuche Macas

1105170060

DEDICATORIA

A mis queridos Padres por el apoyo económico y moral que me han sabido brindar durante toda la carrera.

A mis hermanos Eugenia y Darwin por los consejos de superación y responsabilidad.

A mis sobrinos Juan Pablo, Dereck Sebastián y Kruskaya que han sido mi inspiración para no dejar las cosas ahí y sobretodo enseñarme a ver el mundo con la sencillez con la que ellos lo ven.

A mis amigos que con las vivencias y locuras han hecho que éste trabajo sea más fácil.

César.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja por contribuir a mi formación académica.

A los docentes de la carrera por la paciencia y confianza brindada.

A Oscar Vivanco por ser mi guía en éste trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente Cindy Cuenca.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	4
MARCO TEÓRICO	4
1.1 Criopreservación de hongos.	5
1.2 Métodos de conservación de hongos.....	5
1.2.1 Conservación a corto plazo.....	6
1.2.2 Conservación a largo plazo.....	6
1.2.3 Criocongelación.	7
1.2.4 Liofilización.....	8
1.3 Agentes crioprotectantes (ACP).....	9
1.3.1 Agentes crioprotectantes penetrantes.	10
1.3.2 Glicerol.....	10
1.3.3 Dimetilsulfóxido (DMSO).....	10
1.3.4 Agentes crioprotectantes no penetrantes.	10
1.3.5 Sacarosa.....	11
1.3.6 Aceite mineral.	11
1.4 Hongos Ascomycetes.....	11
1.5 Objetivos.	12
CAPÍTULO II.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Cepas o especímenes.....	14
2.2 Procedimiento experimental.	14
2.3 Análisis estadístico.	15
CAPÍTULO III.....	17

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
3.1 Resultados:.....	18
3.2 Criopreservación a -20°C:	18
3.3 Criopreservación a -80°C:	19
3.4 Criopreservación entre -20°C y -80°C:	20
3.5 Análisis de diferencias significativas entre tratamientos:.....	21
3.6 Discusión:	22
CONCLUSIONES	24
RECOMENDACIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXOS.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de crecimiento de las cepas después de criopreservación mantenidos en glicerol, sacarosa y aceite mineral durante 1 mes a -20°C.	18
Figura 2. Porcentaje de crecimiento de las cepas después de criopreservación mantenidos en glicerol, sacarosa y aceite mineral durante 1 mes a -80°C.	19
Figura 3. Porcentaje de crecimiento de las cepas después de criopreservación mantenidos en glicerol, sacarosa y aceite mineral durante 1 mes entre -20°C y -80°C.	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de hongos Ascomycetes empleados en el experimento de criopreservación proporcionadas por el cepario del herbario HUTPL.....	16
---	----

RESUMEN

La criopreservación de hongos Ascomycetes es fundamental en el mundo actual, ya que la potencialidad de estos microorganismos es marcada tanto en la biotecnología como en la investigación, de ahí la importancia de contar con colecciones bien conservadas que cumplan las premisas de un buen proceso. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de diez especies de hongos Ascomycetes criopreservados a -20°C , -80°C y entre -20°C y -80°C . El método requirió de una incubación en crioprotectantes, seguido de un proceso lento de descongelamiento en baño maría a 37°C con el fin de evitar daños celulares por la cristalización del agua. Finalmente fueron colocados en medio de cultivo MEA para evaluar el potencial de recrecimiento. Se logró determinar que el glicerol a -80°C es el crioprotectante más adecuado para este grupo de hongos, además se logró obtener información importante para criopreservar de una manera idónea otras especies de Ascomycetes así como otros grupos fúngicos que sean de importancia para la ciencia.

Palabras clave: Crioprotectante, temperaturas, viabilidad.

ABSTRACT

Ascomycetes fungi cryopreservation is essential in today's world, as the potential of these microorganisms is marked both biotechnology and research, hence the importance of well-preserved collections that meet the premises of a good process. The aim of this study was to evaluate the feasibility of ten species of fungi Ascomycetes cryopreserved at -20°C , -80°C and between -20°C and -80°C . The method required an incubation crioprotectantes, followed by slow thawing process in a water bath at 37°C in order to prevent cell damage by water crystallization. Finally they were placed in culture medium MEA to evaluate the potential of regrowth. It was determined that glycerol at -80°C is best suited for this group of fungi cryoprotectant addition it was possible to obtain important information in a convenient way cryopreserved other species of Ascomycetes fungal and other groups that are important to science.

Keywords: Cryoprotectant, temperatures, viability.

INTRODUCCIÓN

Los hongos Ascomycetes son muy importantes ya que desempeñan un rol importante en la descomposición de sustratos orgánicos y actúan como mutualistas, parásitos y patógenos de animales, plantas y otros hongos (Brodo et al., 2001).

La preservación de estas cepas de hongos, así, como la información de referencia para la investigación, requiere que los cultivos almacenados permanezcan viables durante largos períodos de tiempo y sin ninguna alteración morfológica o fisiológica.

Para preservar estos hongos, el continuo subcultivo, el almacenamiento en aceite mineral o agua es generalmente utilizado, pero estos métodos son propensos a contaminación, no garantizan la estabilidad genética, morfológica o fisiológica de los cultivos por períodos prolongados de tiempo (Burdshall & Dorworth, 1994; Ryan et al. 2000; Smith & Onions, 1994).

La criopreservación a -20°C , -60°C , -80°C y -130°C en congeladores mecánicos, aunque ha sido poco explorada es una alternativa para la conservación de estos hongos a largo plazo (Hubálek, 2003; Kitamoto et al., 2002). Sin embargo, las temperaturas de congelación son un reto a la criopreservación ya que a menudo el resultado son lesiones criogénicas por la formación de cristales de hielo, la migración de agua y / o la concentración de iones (Mazur, 1984). Para reducir estas lesiones criogénicas se usa agentes crioprotectores (Hubálek, 2003) que disminuyen la formación de hielo y / o aumentan la elasticidad de la membrana plasmática reduciendo la ruptura celular y el aumento de la viabilidad del micelio (Mata & Pérez-Merlo, 2003).

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa) y el dimetil sulfóxido. Los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular (García, 1984; Porcu, 2001).

En el presente trabajo se criopreservó a -20°C , -80°C y entre -20°C y -80°C diez especies de hongos Ascomycetes, lo cual permitirá aportar con datos de mantenimiento y viabilidad de diez cepas de hongos Ascomycetes al fungario HUTPL, y con ello un adecuado manejo en la conservación de hongos los cuales representan un valor importante en la investigación y biotecnología.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Criopreservación de hongos.

La criopreservación es una técnica de almacenamiento a largo plazo con temperaturas muy bajas para preservar las estructuras intactas de las células vivas y tejidos durante un período prolongado de tiempo a un costo relativamente bajo (Mazur, 1984).

La criopreservación en hongos se observó por primera vez en 1960 (Hwang, 1960) y desde entonces varias metodologías han sido optimizadas para la gran mayoría de los grupos fúngicos en el mundo. Para conseguir bajas temperaturas se utilizan dispositivos mecánicos de refrigeración, los cuales controlan la velocidad de enfriamiento (Smith & Ryan, 2012).

Para estabilizar completamente los cultivos congelados Leeson et al., (1984) afirmaron que la temperatura debe ser suficientemente reducida para que la división celular y los procesos metabólicos cesen totalmente, así, el material puede permanecer almacenado por tiempo indefinido sin que sufra modificaciones o alteraciones.

El éxito del proceso depende de las condiciones con las que se maneje el material para que resista tanto el congelamiento, como el descongelamiento, de manera que se evite o disminuya la formación de cristales de hielo que provoca graves daños en las membranas de la gran mayoría de las células (Villalobos & Engelmann, 1995).

El establecimiento de bancos para la criopreservación en todo el mundo es una tarea importante y prometedora en el futuro (Tsai & Lin, 2012). En la actualidad se utilizan diversos métodos de conservación, los cuales dependen por una parte de las especies que se desean mantener y por otra de los recursos disponibles. No todos los métodos son exitosos para las distintas especies, por lo que se recomienda emplear en cada caso los métodos que hayan probado ser los más adecuados de acuerdo con las características de cada especie (Smith & Onions, 1994).

1.2 Métodos de conservación de hongos.

Las colecciones de cultivos puros constituyen una herramienta de importancia para diferentes ramas de las ciencias, es por ello, que se han desarrollado alternativas en cuanto a métodos de conservación para preservar cepas de hongos por largos períodos de tiempo (Pasarell & McGinnis, 1992).

García & Uruburu (1991) clasificaron los métodos en conservación a corto plazo y a largo plazo.

1.2.1 Conservación a corto plazo.

Entre el más comúnmente utilizado tenemos:

Continuo subcultivo: Éste es un método muy simple con el que se puede mantener la viabilidad de algunos microorganismos por muchos años, con una recuperación de cultivos activos relativamente fácil. En el caso de colecciones pequeñas, éste puede ser un método económicamente factible en cuanto al equipamiento y al tiempo que se invierte (Merck, 2000).

La cepa fúngica se guarda en forma de cultivo activo en el medio en el que ha crecido, consiste en la transferencia del cultivo a un medio fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo, estos intervalos varían dependiendo de las características del cultivo en cuestión. Algunas especies requieren ser transferidas a nuevos medios después de días o semanas, y otras después de meses o años, esta frecuencia puede reducirse con el almacenamiento del subcultivo a temperaturas relativamente bajas, bajo aceite mineral o agua (Stevenson & Jong, 1992; Snell, 2001). Pero existen algunas limitaciones del continuo subcultivo, como, el riesgo de contaminación; cambios genéticos, el cual se incrementa a mayor número de transferencias; pérdida del cultivo, sobre todo cuando se trabaja con cultivos delicados; deshidratación del medio de cultivo; y el trabajo es muy intenso ya que se requiere de un espacio grande para el almacenamiento (Hawksworth & Schipper, 1995; Onions, 1971; Snell, 2001).

1.2.2 Conservación a largo plazo.

El almacenamiento a largo plazo es muy seguro, por lo que se usa extensivamente en la investigación (Benson et al., 2006).

Para el almacenamiento a largo plazo generalmente se utiliza la criopreservación, que es el mejor método porque detiene el crecimiento de las células sin provocar la muerte, garantizando la estabilidad genética al evitarse la aparición de generaciones sucesivas, pero, aun así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo (Tello et al., 1991).

García & Uruburu (1991) clasificaron a los métodos de conservación a largo plazo en: criocongelación y liofilización.

1.2.3 Criocongelación.

Este método consiste en almacenar las células con un agente crioprotectante a temperaturas inferiores a cero grados centígrados. El agua en el interior de la célula se congela suspendiendo la actividad metabólica, impidiendo así el crecimiento, de ésta manera cuando se requiera trabajar con las células así conservadas se las recupera subiendo la temperatura (Kirsop, 1999). Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero, tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales y además existe el peligro de que algún fallo del sistema de refrigeración produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento (García & Uruburu, 1991).

El proceso de congelación se puede clasificar con base en la temperatura en la que se lleva a cabo en: Congelación ordinaria, congelación ultrafría y congelación con nitrógeno líquido (Hernández. & Loaiza, 2014).

Congelación ordinaria: Durante la congelación ordinaria se mantienen temperaturas de -5°C a -20°C; en este intervalo, los microorganismos permanecen viables, es decir, una vez descongelados los microorganismos conservan todas sus funciones y características por uno o dos años, el método no se recomienda para periodos de almacenamiento mayores (Hernández. & Loaiza, 2014).

Congelación ultrafría: Se efectúa en congeladores mecánicos a temperaturas entre -50°C y -80°C. Al cultivo se lo suspende en un medio de cultivo con un agente crioprotectante y son almacenados en tubos especiales (Hernández & Loaiza, 2014).

Congelación con nitrógeno líquido: Es el método de conservación por congelación más recomendado, porque se logran temperaturas de -150°C a -196°C. La velocidad de congelación debe ser de 1 a 2°C/min hasta alcanzar una temperatura de -30°C, luego 1°C/min hasta -56°C. Después, se colocan las muestras directamente en nitrógeno líquido para acelerar el proceso de congelación (Hernández. & Loaiza, 2014).

El metabolismo celular se detiene completamente a partir de los -130°C; por esta razón, si el microorganismo soporta el proceso de congelación, su viabilidad permanece durante muchos años. Una de las principales ventajas de este método es que son innecesarias las resiembra, por lo que se reducen al mínimo los riesgos de contaminación, los cambios genéticos y bioquímicos en el microorganismo. Sin embargo, el costo del equipo requerido es alto y es necesario mantener un suministro constante de nitrógeno, lo que encarece el

proceso. Además, es imprescindible tomar previsiones en cuanto a fallas mecánicas y eléctricas para evitar perder toda una colección (Hernández & Loaiza, 2014).

1.2.4 Liofilización.

La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío, este proceso consta de tres etapas, la precongelación del producto para asegurar una estructura completamente congelada; el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación; y el secado secundario con el que se remueve el agua que queda ligada (Sharma & Smith, 1999).

En las células conservadas por este método no hay crecimiento puesto que la actividad de agua es cero igual que en la congelación pero a diferencia de la primera, los liofilos no tienen agua en el medio debido a la sublimación, para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores. Sin embargo, este es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos los liofilos pueden almacenarse a una temperatura ambiente de 18°C a 20°C (Malik, 1996).

El éxito de la liofilización para la preservación de los cultivos no sólo depende de los pasos de esta técnica (congelación y deshidratación) sino también de las características físico-químicas del medio, el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo, la concentración de los microorganismos, entre otros (Snell, 1997).

Los factores que influyeron específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación según Floccari (2000) son:

Tipo de microorganismo: Hay algunos microorganismos que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior, algunos hongos filamentosos, especialmente los no esporulados, no se pueden guardar liofilizados y hay que recurrir a otros métodos.

Temperatura durante la sublimación: Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C.

Grado de deshidratación alcanzado: Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.

Atmósfera de oxígeno en el tubo: Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.

Condiciones de almacenamiento: La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C. Los liófilos se deben guardar en la oscuridad.

Este método es uno de los más eficaces para la conservación de hongos, pueden sobrevivir por períodos de más de 40 años (Stevenson & Jong, 1992).

Sin embargo, estos métodos de conservación a largo plazo presentan limitaciones debido a la formación de cristales de hielo que pueden romper las células y, a su vez, causar efectos negativos al microorganismo en la etapa de reactivación, por esto se emplean agentes crioprotectores (Sánchez-Leal & Corrales-Ramírez, 2005).

1.3 Agentes crioprotectores (ACP).

Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad (García, 1984; Porcu, 2001), impiden por interacción molecular con el agua la acción destructiva del congelamiento sobre las células, es decir, protegen de la formación de cristales de hielo (Hubalek, 2003).

Una de las hipótesis en las cuales se basa el efecto de los agentes crioprotectores es en que las características físico-químicas de estas sustancias le confieren afinidad por el agua molecular y de esa forma atrapan la molécula de agua en su interior, lo que impide que el agua forme cristales geométricos ordenados; en consecuencia, la solidificación del medio se establece con una distribución molecular desordenada del agua y la sustancia toma el carácter de sustancia vítrea protectora (García et al., 1991; Van, 2003).

Algunos de los crioprotectores presentan toxicidad para la célula viva a temperatura ambiente, por lo tanto en los procesos de congelación y descongelación se debe tener en cuenta los tiempos de exposición de las células a estas sustancias (Sánchez-Leal & Corrales-Ramírez, 2005).

La división tradicional de los agentes crioprotectores depende de la tasa de penetración, por lo tanto, pueden ser distinguidos en: agentes crioprotectores penetrantes y agentes crioprotectores no penetrantes (Tao & Li, 1986).

1.3.1 Agentes crioprotectantes penetrantes.

Los agentes crioprotectantes penetrantes son pequeñas moléculas capaces de atravesar las membranas celulares, su función es reducir la acumulación del hielo y la deshidratación celular durante la congelación (Wowk, 2007), el mecanismo es cruzar la membrana plasmática y entrar en la célula. Además, también reducen la concentración de sales (Amann & Pickett, 1987). Los más comunes son: Glicerol y DMSO (dimetil sulfóxido).

1.3.2 Glicerol.

El glicerol es un soluto poli hidroxilado pequeño con una alta solubilidad en agua y una baja toxicidad durante la exposición a corto plazo a las células vivas, puede interactuar por enlaces de hidrógeno con agua y penetrar a través de la membrana plasmática limitante de muchos tipos de células, aunque a un ritmo relativamente lento (Fuller, 2004).

La alta viscosidad del glicerol es otra propiedad que pueden inhibir o retardar el crecimiento de cristales de hielo durante el descenso de la temperatura (Fuller, 2004). Éste es ampliamente usado, ya que también disminuye el estrés osmótico intracelular resultante de la deshidratación, la cual se produce por la sustitución del agua necesaria para el mantenimiento del volumen celular, por la interacción con iones y macromoléculas e incluso por la depresión del punto de congelación del agua (Medeiros et al., 2002).

1.3.3 Dimetil sulfóxido (DMSO).

El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar aprótico hidrosoluble de bajo peso molecular, su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, también previene la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana (García, 1984).

1.3.4 Agentes crioprotectantes no penetrantes.

Los agentes crioprotectantes no penetrantes son de alto peso molecular, generalmente polímeros, son efectivos a velocidades altas de congelación, además son importantes por ejercer su acción crioprotectante promoviendo la rápida deshidratación celular, pero no entran en las células, son generalmente menos tóxicos que los crioprotectantes penetrantes a la misma concentración (Ávila et al., 2006; Wowk, 2007).

Dentro de este grupo los más utilizados son: Sacarosa y aceite mineral.

1.3.5 Sacarosa.

La sacarosa es un polímero que forma puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de la misma, se sintetiza en plantas, pero no en animales superiores, es efectiva a velocidades altas de congelación, tiene un alto peso molecular y es importante por ejercer su acción crioprotectante promoviendo la rápida deshidratación celular (Ávila et al., 2006; Teijon, 2006).

La sacarosa también estabiliza las membranas durante la exposición hipertónica a medida que aumentan los cristales de hielo, mediante la interacción con grupos de fosfolípidos, es utilizada con bastante frecuencia a un porcentaje de concentración medio del 10% (Hubalek, 2003).

1.3.6 Aceite mineral.

Es un alcano derivado del petróleo, los cultivos de hongos que se mantienen bajo aceite mineral se han utilizado durante muchos años para reducir el crecimiento y extender el intervalo de tiempo entre las transferencias a medio fresco (Buell & Weston, 1947; Fennell, 1960), es barato, fácil y se recomienda para laboratorios con recursos limitados (Johnson & Martin, 1992; Perrin, 1979). Es un procedimiento muy simple, los cultivos conservados de ésta manera se pueden transferir fácilmente, el método es aplicable a una amplia gama de hongos, y es un medio simple para el control de ácaros (Smith & Onions, 1983).

Los cultivos pueden mantenerse en casos excepcionales de hasta 32 años a temperatura ambiente o en -15 y -20°C (Homolka, 2013). Aunque muchos hongos se pueden mantener de esta manera, las tasas de crecimiento de los cultivos pueden disminuir a medida que los tiempos de almacenamiento aumentan (Johnson & Martin, 1992).

1.4 Hongos Ascomycetes.

Pertencen al filo Ascomycota, con aproximadamente 64 000 especies conocidas (Kirk et al., 2008), es el más grande filo de hongos. Estos hongos pueden desarrollarse en numerosos nichos ecológicos y virtualmente en todos los ecosistemas terrestres y acuáticos. Muchas especies de Ascomycetes funcionan en la descomposición de sustratos orgánicos, actúan como mutualistas, parásitos, patógenos de animales, plantas y otros hongos (Brodo et al., 2001).

Dentro de las diez especies de Ascomycetes utilizadas en el presente estudio, se incluyen algunas cepas de gran importancia económica, algunos a manera de patógenos y otros como controladores biológicos productores de antibióticos y micotoxinas (Hidalgo, 1989) es por ello la importancia de mantenerlos puros y por periodos prolongados de tiempo.

1.5 Objetivos.

General:

Criopreservar a -20°C , -80°C y entre -20°C y -80°C diez especies de hongos Ascomycetes.

Específicos:

Evaluar la viabilidad de diez especies hongos Ascomycetes criopreservados a -20°C , -80°C y entre -20°C y -80°C en glicerol al 10%, sacarosa al 10% y aceite mineral puro, durante un mes.

Determinar las mejores condiciones para la conservación de cepas fúngicas.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas o especímenes.

Las diez cepas de hongos Ascomycetes fueron donados por el fungario de la Universidad Técnica Particular de Loja (Tabla 1), y que según la literatura (Brodo et al., 2001; Hidalgo, 1989) son importantes por su uso y aplicación en la investigación y biotecnología.

2.2 Procedimiento experimental.

La metodología utilizada para los ensayos de conservación fue tomada de Crahay et al., 2013. A continuación se indica en cada apartado el procedimiento a seguir.

Paso 1. Aislados en medio de cultivo MEA.

Las diez cepas de hongos Ascomycetes fueron mantenidas en cajas petri a través de continuo subcultivo en medio de cultivo MEA (agar extracto de malta, Sigma-Aldrich). Se realizaron varias réplicas con el fin de tener material suficiente para los ensayos posteriores, finalmente fueron incubadas en la obscuridad a 27°C durante dos semanas antes de su uso en los experimentos de criopreservación.

Paso 2. Diseño experimental.

Cinco réplicas de cada una de las diez cepas de hongos no fueron sometidas a ningún tratamiento, pero fueron considerados como control de crecimiento de las cepas. Para el experimento de criopreservación, de las diez cepas de hongos Ascomycetes se tomó en cuenta cinco réplicas para cada uno de los tres tratamientos en las tres diferentes temperaturas, teniendo así un total de 15 réplicas por temperatura, es decir, en las tres diferentes temperaturas sumaron 45 réplicas en total por especie.

- Temperatura ambiente (CONTROL DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS) (5 réplicas) (1 mes).
- -20°C, glicerol (5 réplicas), sacarosa (5 réplicas) y aceite mineral (5 réplicas) (1 mes).
- -80°C, glicerol (5 réplicas), sacarosa (5 réplicas) y aceite mineral (5 réplicas) (1 mes).
- -20 y -80°C, glicerol (5 réplicas), sacarosa (5 réplicas) y aceite mineral (5 réplicas) (1 mes).

Paso 3. Inoculación de la cepa a un crioval.

Con la ayuda de un asa metálica, cada uno de los diez aislados fúngicos fueron transferidos a un tubo criogénico estéril (Corning® 2mL) que contenía 1000ul de medio MEA.

Paso 4. Incubación de criovales.

Los criovales fueron incubados durante dos días en la obscuridad a 27°C, hasta que el crecimiento del hongo haya cubierto completamente la superficie del gel en el tubo.

Paso 5. Adición del crioprotectante.

Una vez crecidos en su totalidad los cultivos, 500ul de cada crioprotectante (glicerol al 10%, sacarosa al 10% y aceite mineral puro) fue agregado a cada una las cepas fúngicas de acuerdo al tratamiento.

Paso 6. Criopreservación a -20°C.

Luego de haber agregado cada uno de los crioprotectantes, los criotubos fueron almacenados rápidamente en un congelador mecánico a -20°C durante un mes.

Paso 7. Criopreservación a -80°C.

De la misma forma que el paso seis, las cepas fueron almacenadas rápidamente en un congelador mecánico a -80°C.

Paso 8. Criopreservación entre -20°C y -80°C.

En este caso, una vez que añadimos los 500ul de cada crioprotectante al tubo, almacenamos durante 15 días en un congelador mecánico a -20°C, una vez cumplido este tiempo, las cepas fueron transferidas al congelador a -80°C durante 15 días más, cumpliendo de ésta manera un mes en temperaturas entre -20°C y -80°C.

Paso 9. Descongelación directa en baño maría y transferencias de las cepas en medio MEA.

Se evaluó la viabilidad de cada aislado en relación al tiempo de preservación, acción del crioprotectante y temperatura. Para ello, las cepas fueron descongeladas rápidamente en un baño maría a 37°C por 15 minutos y fueron transferidas a cajas petri con medio de cultivo MEA, para ser incubadas a 27°C durante una semana en la obscuridad.

2.3 Análisis estadístico.

Para la determinación del porcentaje de viabilidad de las cepas se calculó la media de crecimiento por cada cepa, además se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA)

en Excel 2010 para determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos en los tres regímenes de temperaturas.

Tabla 1. Cepas de hongos Ascomycetes empleados en el experimento de criopreservación proporcionadas por el cepario del herbario HUTPL.

CÓDIGO DE CEPA	Especie
IR57C	<i>Bionectria</i> sp.
IR37C_B	<i>Mortierella</i> sp.
IR43C	<i>Trichoderma</i> sp 1.
IR67C	<i>Trichoderma</i> sp 2.
IR87C	<i>Trichoderma viride</i> .
IR22C	<i>Fusarium culmorum</i> .
IR30C	<i>Hypocreales</i> sp 1.
IR16C	<i>Fusarium</i> sp.
IR45C	<i>Hypocreales</i> sp 2.
IR35C	<i>Arthrinium kogelbergense</i> .

Fuente: El autor, 2015.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados:

Se logró evaluar el porcentaje de viabilidad de diez especies de hongos Ascomycetes (Tabla 1), sometidos a criopreservación en tres regímenes de temperatura y en tres crioprotectantes.

3.2 Criopreservación a -20°C:

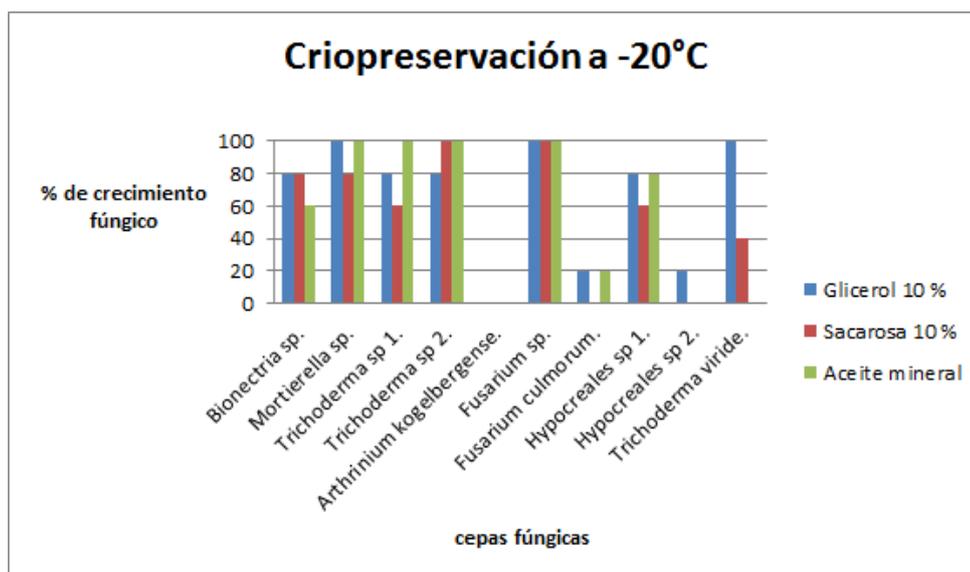


Figura 1. Porcentaje de crecimiento de las cepas después de criopreservación mantenidos en glicerol, sacarosa y aceite mineral durante 1 mes a -20°C.
Fuente: El autor, 2015.

En éste régimen de temperatura la cepa *Arthrinium kogelbergense* no registró crecimiento fúngico en glicerol, sacarosa y aceite mineral (Figura 1). Sin embargo, la cepa *Fusarium* sp. mostró un crecimiento del 100% sometida a los tres crioprotectantes (Figura 1).

En glicerol al 10% las cepas que tuvieron el mejor crecimiento fúngico con el 100% fueron: *Mortierella* sp. y *Trichoderma viride*. En sacarosa al 10% únicamente la cepa *Trichoderma* sp 2. y finalmente en aceite mineral la cepas: *Mortierella* sp., *Trichoderma* sp 1. y *Trichoderma* sp 2. (Figura 1).

Entre las cepas que no presentaron crecimiento fúngico tenemos: en sacarosa al 10% *Fusarium culmorum* e *Hypocreales* sp 2. y finalmente en aceite mineral *Hypocreales* sp 2. y *Trichoderma viride* (Figura 1).

3.3 Criopreservación a -80°C:

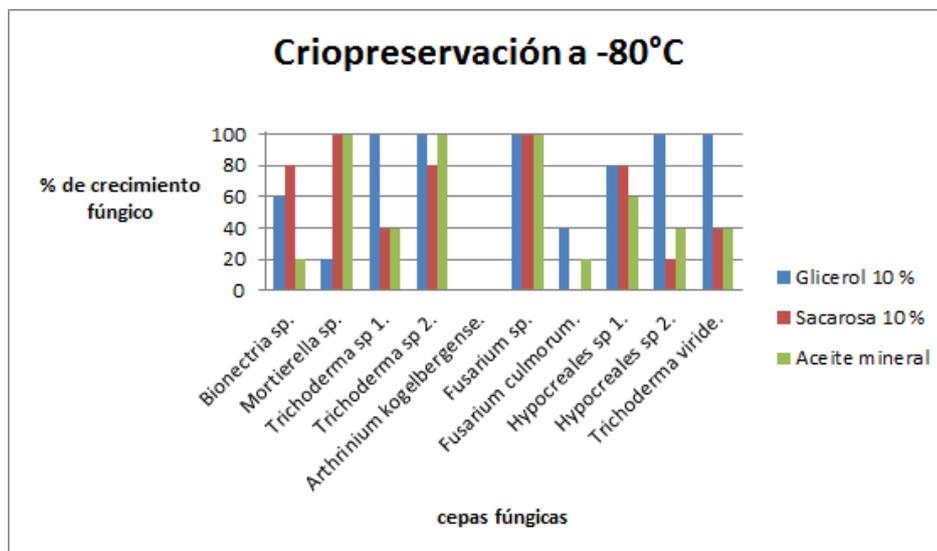


Figura 2. Porcentaje de crecimiento de las cepas después de criopreservación mantenidas en glicerol, sacarosa y aceite mineral durante 1 mes a -80°C.
Fuente: El autor, 2015.

Entre las cepas evaluadas a -80°C se determinó de igual manera que en la criopreservación a -20°C, que la cepa *Arthrinium kogelbergense* no presentó crecimiento en ninguno de los tres tratamientos. Sin embargo, en *Fusarium sp.* se muestra que la cepa tiene un crecimiento del 100% sometida a los tres crioprotectantes (Figura 2).

En glicerol al 10% las cepas que tuvieron crecimiento fúngico del 100% fueron: *Trichoderma sp 1.*, *Trichoderma sp 2.*, *Hypocreales sp 2.* y *Trichoderma viride*. En sacarosa al 10% únicamente *Mortierella sp.* y finalmente en aceite mineral las cepas *Mortierella sp.* y *Trichoderma sp 2.* (Figura 2).

La única cepa que no presentó crecimiento en sacarosa al 10% fue *Fusarium colmorum* (Figura 2).

3.4 Criopreservación entre -20°C y -80°C:

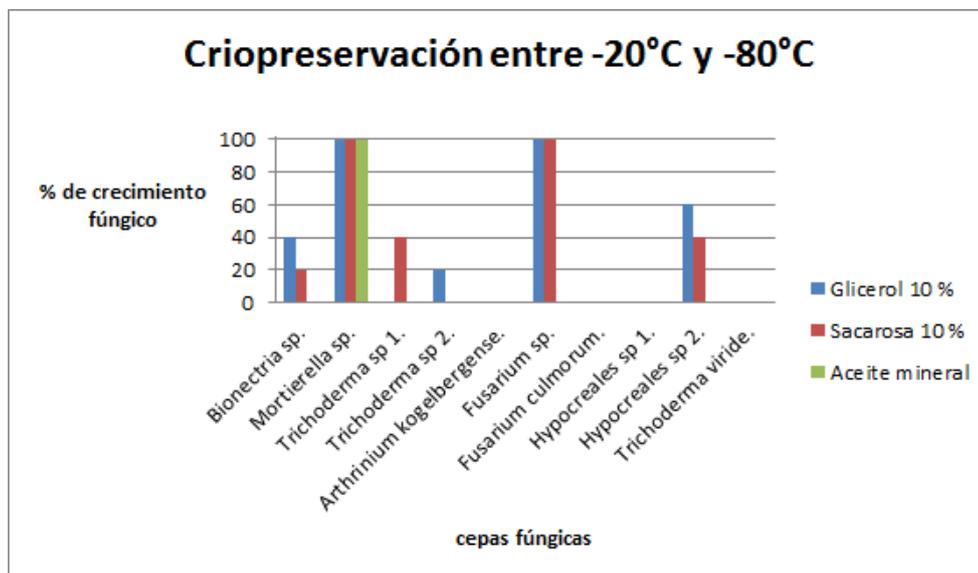


Figura 3. Porcentaje de crecimiento de las cepas después de criopreservación mantenidos en glicerol, sacarosa y aceite mineral durante 1 mes entre -20°C y -80°C.
Fuente: El autor, 2015.

En la criopreservación entre -20°C y -80°C con glicerol, sacarosa y aceite mineral observamos que *Arthrinium kogelbergense.*, *Fusarium colmorum.*, *Hypocreales sp 1.* y *Trichoderma viride* no registran crecimiento fúngico. Sin embargo, contrariamente a lo anterior se observó que la cepa *Mortierella sp.* obtuvo un 100% de crecimiento en los tres crioprotectantes (Figura 3).

La cepa *Fusarium sp.* tuvo el 100% de crecimiento fúngico en glicerol y sacarosa al 10%, mientras que en aceite mineral la cepa *Mortierella sp.* fue la única cepa que creció en éste tratamiento con el 100% de crecimiento (Figura 3).

Finalmente podemos determinar que luego de evaluar las cepas sometidas a varias temperaturas y a la acción de los crioprotectantes, la criopreservación a -20°C mostró ser más efectiva que a -80°C en cuanto al porcentaje de germinación de las siguientes cepas: En glicerol al 10% *Mortierella sp.* y *Bionectria sp.*, en sacarosa al 10% *Trichoderma sp 1.* y *Trichoderma sp 2.*, y finalmente en aceite mineral *Trichoderma sp 1.*, *Hypocreales sp 1.* y *Bionectria sp.* (Figura 1 y 2).

En el caso de las cepas criopreservadas que resultaron tener mejor crecimiento fúngico a -80°C en comparación con -20°C fueron: En glicerol al 10% *Trichoderma sp 1.*, *Trichoderma sp 2.* e *Hypocreales sp 2.*, en sacarosa al 10% las cepas *Mortierella sp.*, *Hypocreales sp 1.*,

e *Hypocreales* sp 2. y finalmente en aceite mineral *Fusarium colmorum* y *Trichoderma viride* (Figura 1 y 2).

3.5 Análisis de diferencias significativas entre tratamientos:

En el análisis de varianza de un factor (ANOVA) realizado en Excel 2010 para determinar diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos (glicerol, sacarosa y aceite mineral), y en los tres regímenes de temperatura (-20°C , -80°C y entre -20°C y -80°C), se determinó lo siguiente:

Criopreservación a -20°C :

En el análisis de varianza de un factor entre tratamientos a -20°C el valor de F normal (0,30233) es inferior a uno y menor al F crítico (3,3541), es decir que no existe una diferencia significativa entre crioprotectantes ($P < 0.05$).

Criopreservación a -80°C :

En el caso de la criopreservación a -80°C el análisis de varianza nos da un valor de F normal (0,67732) inferior a uno y menor al F crítico (3,3541) lo cual nos indica que también en éste régimen de temperatura no existen diferencias significativas entre crioprotectantes ($P < 0.05$).

Criopreservación entre -20°C y -80°C :

En el análisis de varianza en la criopreservación entre -20°C y -80°C nos muestra que el valor de F normal (1,02567) es mayor a uno y menor al F crítico (3,3541), por lo que nos muestra así una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre crioprotectantes.

3.6 Discusión:

En el presente estudio la cepa *Fusarium* sp. mostró un 100% de crecimiento fúngico en glicerol, sacarosa y aceite mineral almacenado a -20°C y -80°C respectivamente (Figura 1 y 2). En un estudio similar realizado con éste mismo género, se determinó un alto porcentaje de viabilidad luego de ser criopreservado a -80°C en aceite mineral y glicerol al 10% (Pinzón et al., 2009).

Ninguno de los crioprotectantes y temperaturas de conservación fue exitoso para *Arthrimum kogelbergense* ya que no presentó crecimiento fúngico (Figuras 1,2 y 3), esto pudo ser probablemente debido a un efecto tóxico de los crioprotectantes utilizados en el experimento (Fahy, 2009).

Criopreservación a -20°C:

Las cepas *Fusarium culmorum.*, *Hypocreales* sp 2. y *Trichoderma viride* tuvieron una baja sobrevivencia al ser sometidas al congelamiento lento a -20°C (Figura 1), probablemente a que la temperatura pudo aumentar la concentración o formación iónica de sales y con ello la cristalización de hielo intracelular (Pegg, 2007 y Ueno et al., 2004) reduciendo de esta manera el crecimiento de las cepas mencionadas. Así mismo, se encontraron antecedentes en otro estudio con *Pleurotus ostreatus* una especie de Basidiomycete criopreservado a -20°C en la que redujo su viabilidad luego de tres años de almacenamiento (Mantovani et al., 2012).

Criopreservación a -80°C:

Las cepas *Fusarium* sp., *Hypocreales* sp 1. y *Trichoderma* sp 2. tuvieron un alto porcentaje de viabilidad en ésta temperatura. En un estudio similar con diez especies de hongos micorrícicos de orquídeas se probó que el método de almacenamiento a -80°C es muy eficaz para el almacenamiento a largo plazo (Ercole et al., 2013). Siete cepas disminuyeron su viabilidad dependiendo del crioprotectante usado (Figura 1 y 2), relacionando así directamente el efecto que causa el crioprotectante en el crecimiento de las cepas. Esto se atribuye a que posiblemente los crioprotectantes al ser usados en concentraciones muy altas (Hawkins et al., 1985, Karow, et al., 1986) algunas veces tienen efectos tóxicos particularmente a temperaturas altas (Fahy, 2009).

Criopreservación entre -20°C y -80°C:

Mortierella sp. fue la única cepa que sometida al efecto del cambio de temperatura entre -20°C y -80°C fue 100% viable (Figura 3), considerando así que la variación de temperatura en esta especie no afectó su viabilidad. En un estudio similar con éste género, ésta cepa fue criopreservada mediante un enfriador de velocidad controlada en glicerol al 10% sometida a varios regímenes de temperatura siendo excelente su recuperación (Ryan et al., 2012).

Por otro lado, en ésta evaluación también hay una afectación notablemente significativa en cuanto a la reducción del crecimiento fúngico en la mayoría de las cepas restantes en experimentación. Ivanushkina y asociados (2010) determinaron que no todas las cepas sobrevivieron a la criopreservación en todos los regímenes de congelación y modificación aplicadas al evaluar cepas de Oomycetes, Basidiomycetes, Zigomycetes y Ascomycetes con un porcentaje de viabilidad del 20, 4, 1 y 1% respectivamente. Así mismo se encuentran antecedentes en un estudio similar de Boiso (2001) en la que determina que esto se debe a que el cambio de temperatura de -20°C a -80°C afecta a la viabilidad de las especies ya que se forman cristales de hielo intracelularmente, además que tienen un efecto severo en el deterioro de las proteínas, esto se produce por una alteración estructural de la cadena polipeptídica y cambios en los aminoácidos (Buttkus, 1970). También Homolka, (2013) afirmó que la fluctuación de la temperatura durante el almacenamiento afecta negativamente la viabilidad de los hongos.

En el caso de los agentes crioprotectantes podemos decir que ejercen un efecto muy importante dependiendo de la especie analizada y la temperatura de mantenimiento. En éste estudio se determinó que la aplicación de glicerol al 10% fue la que evidenció mejores resultados de viabilidad en la mayoría de las cepas. En estudios similares se ha evidenciado que el glicerol reduce la cantidad de cristales de hielo que se producen evitando de esta manera el aumento de la concentración iónica (Heinz & Mortimer, 1995), además, es considerado uno de los crioprotectantes más eficaces en la criopreservación de hongos (Jong & Birmingham, 2001) por el alto porcentaje de viabilidad mostrado luego de ensayos de criopreservación.

CONCLUSIONES

El grupo de Ascomycetes manipulados en los ensayos de criopreservación del presente estudio permiten dar una guía de mantenimiento de condiciones básicas para la preservación de hongos de este tipo en diferentes colecciones como la del herbario HUTPL.

Los métodos de congelación utilizados tuvieron resultados satisfactorios para ciertas especies, mientras que para otras no lo fueron, por lo que se mantiene con esto el concepto de que no hay un método específico para cada grupo fúngico.

Se determinó que el glicerol es el crioprotectante más adecuado para la preservación de las especies fúngicas evaluadas independientemente de la temperatura de mantenimiento.

Se considera la temperatura de -80°C como la más apropiada para la conservación de las especies fúngicas evaluadas.

Los cambios de temperatura muestran el porcentaje más bajo de crecimiento y viabilidad en la mayoría de cepas estudiadas.

RECOMENDACIONES

Evaluar la criopreservación de Ascomycetes con un tiempo mínimo de seis meses para así obtener valores significativos que puedan reflejarse en una temperatura óptima.

Realizar la criopreservación con más especies de Ascomycetes y otros grupos fúngicos para evaluar la efectividad del método empleado en ésta investigación.

Llevar a cabo ésta investigación utilizando otro tipo de crioprotectantes y evaluar su efectividad.

Utilizar colonias identificadas al menos hasta nivel de especie para realizar el proceso de conservación, ya que es necesario conocer el microorganismo para de esta manera darle un óptimo tratamiento a la cepa y poder establecer condiciones adecuadas de conservación.

BIBLIOGRAFÍA

Amann, R. & Pickett, B. (1987). Principles of cryopreservation and review of criopreservation of stallion spermatozoa. *Equine veterinaria*, 7:145-173.

Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J. & Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57:291-300.

Benson, E., Johnston, J., Muthusamy, J. & Harding, K. (2006). Physical and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation. En: Gupta, D.S., Ibaraki, Y. *Plant Tissue Culture Engineering*. Springer, 441-476.

Boiso, I. (2001). Principios básicos de Criobiología. Servicio de Medicina de la Reproducción. Departamento de Obstetricia y Ginecología. Barcelona: Institut Dexeus, 18: 20-22.

Brodo, I., Sharnoff, S. & Sharnoff, S. (2001). *Lichens of North America*. New Haven: Yale University Press, 5:4-134.

Buell, C., & Weston, W. (1947). Application of the mineral oil conservation method maintaining collections of fungus culture. *American Journal of Botany*, 34:555-561.

Burdsall, H. & Dorworth, E. (1994). Preserving cultures of wood decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia*, 86:275–280.

Buttkus, H. (1970). Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. *Journal of Food Science*, 35:558-562.

Crahay, C., Declerck, S., Colpaert, J., Pigeon, M. & Munaut, F. (2013). Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. *Fungal Biology*, 117:103-111.

Ercole, E., Rodda, M., Molinatti, M., Voyron, S., Perotto, S. & Girlanda, M. (2013). Criopreservación de orquídea micorrhizal fungi: A tool for the conservation of endangered species. *Journal of microbiology methods*, 93:134-137.

Fahy, G. (2009). Cryoprotectant toxicity neutralization. *Criobiology*, 60:45-53.

Fennell, D. (1960). Conservation of fungus cultures. *Botanical Review*, 26:79–141.

Floccari, M. (2000). Métodos de conservación de cultivos bacterianos. *Revista Argentina de Microbiología*, 30:42-51.

Fuller, B. (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo letters*, 25: 88-375.

García, J. (1984). Criopreservadores concepto y manejo. *Hematology: Biology Clinical*, 6:219-225.

García, L., Scherer, C. & Rodríguez, R. (1991). Líquidos sobreenfriados y vidrios [en línea]. La ciencia para todos biblioteca digital. Física. Fondo de Cultura Económica. México. [Consulta: 30 de septiembre del 2015] Disponible en: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/menu.htm>.

García, M. & Uruburu, F. (1991). La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo. *Universitat de València*, 30:12-15.

Hawkins, P., Clark, E., Lippert, A. & Karow, Jr. (1985). Functional preservation of the mammalian kidney, viability assessment of rabbit kidneys perfused at 25°C with dimethyl sulfoxide. *Surgical Research*, 38:281–288.

Hawksworth, D. & Schipper, M. (1995). Criteria for consideration in the accreditation of culture collection participating in MINE. The microbial information Network Europe. *MIRCEB Journal*, 34:277-281.

Heinz, S. & Mortimer, P. (1995). Principles of isolation, cultivation and conservation of bacteria. Chapter 5. The Prokaryotes. "A Handbook on Habitats, isolation and identification of Bacteria. Heinz Edition, 167-172.

Hernández, S. & Loaiza, C. (2014). Selección de un método para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad tecnológica de Pereira [trabajo de grado]. Facultad de tecnología escuela de tecnología química Pereira.

Hidalgo, A. (1989). Comparación de dos métodos para la selección de aislamientos de *Trichoderma* para el combate biológico de *Fusarium* y *Rhizoctonia* en clavel [trabajo de grado] Tesis para optar por el grado de Licenciado en Agronomía. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica.

Hill, L. (2000). *Living Resources for Biotechnology*. Cambridge. Cambridge Edition.

- Homolka, L. (2013). Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved, 118:25-107.
- Hubálek, Z. (2003). Review. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Criobiology*, 46:205-229.
- Hwang, S. (1960). Effects of ultralow preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Mycologia*, 52:527–529.
- Ivanushkina, N., Kochkina, G., Eremina, S. & Ozerskaya, S. (2010). Experience in using modern methods of long-term preservation of VKM fungi. *Mikol Phytopathol*, 44:19–30.
- Johnson, G. & Martin, A. (1992). Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under oil. *Canadian Journal of Microbiology*, 38:861-864.
- Jong, S. & Birmingham, J. (2001). Cultivation and Preservation of Fungi in Culture. En: *The Mycota VII Part B, Systematics and Evolution*. Mclaughlin/Mclaughlin/lemke (eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 193-202.
- Karow, Jr., McDonald, M., Dendle, T. & Rao, R. (1986). Functional preservation of the mammalian kidney. Autologous transplantation of dog kidneys after treatment with dimethyl sulfoxide. *Transplantation*, 41:669-674.
- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D. & Stalpers, J. (2008). *Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi*. 10th ed. Wallingford, UK. CAB International.
- Kirsop, B. (1999). *The stability of industrial organisms*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Edition, 100-106.
- Leeson, E., Cann, J. & Morris, G. (1984). Maintenance of algae and protozoa. En: Kirsop, B.E., Snell, J.J.S. (eds). *Maintenance of microorganisms*. London Academic, 131-160.
- Mata, G. & Pérez-Merlo, R. (2003). Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. *Cryobiology*, 47:14–20.
- Malik, K. (1996). Technical information for culture collections curators in developing countries. Education Committee. Braunschweig, 87-90.
- Mantovani, T., Tanaka, S., Umeo, S., Zaghi, L., Silveira, J., Doretto, L., Andrea, G. & Nelson, B. (2012). Cryopreservation at -20°C and -70°C of *Pleurotus ostreatus* on Grains. *Indian Journal Microbiology*, 52:484-488.

- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal Physiology*, 247:125-147.
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A. & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*, 57:44-327.
- Merck, E. (2000). *Microbiology Manual. Second Edition. Darmstat. Merck KGAA Edition*, 407-410.
- Onions, A. (1971). Preservation of fungi. In: Booth C (ed.), *Methods in Microbiology*. New York and London. Academic Pressure, 4:113-115.
- Pasarell, L. & McGinnis, M. (1992). Viability of fungal cultures maintained at -70°C . *J. Clinical Microbiology*, 30:1000-1004.
- Pegg, D. (2007). Principles of cryopreservation. En: Day, J.G., Stacey, G.N. (Ed.). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Totowa Humana, 39-57.
- Perrin, P. (1979). Long-term storage of cultures of woodin habiting fungi under mineral oil. *Mycologia*, 71:86-869.
- Pinzón, Y., Bustamente, S. & Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11:8-18.
- Porcu, E. (2001). Oocyte Criopreservation. En: Gardner, D.K., Weissman, A., Howles, C.M., Shoham, Z. (eds). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. London, UK. Martin Dunitz Ltd.
- Ryan, M., Smith, D. & Jeffries, P. (2000). A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16:183-186.
- Ryan, M., Kasulyte-Creasey, D., Kermode, A., San, P. & Buddie, A. (2012). Controlled rate cooling of fungi using a stirling cycle freezer. CABI, Bakeham Lane, Egham Surrey TW20 9TY. UK.
- Sánchez-Leal, L. & Corrales-Ramírez, L. (2005). Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. *Nova*, 3:109-113.

Sharma, B. & Smith, D. (1999). Recovery of Fungi after Storage for over a Quarter of a Century. Technical Communication. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15:517-519.

Sly, LI. (1994.) Culture Collections World-wide. En: The biodiversity of microorganisms and the role of Microbial Resource Centres. Kirshop, B., Hawksworth, D. ed. Surrey: World Federation for Culture Collections Biodiversity Committee, 29-35.

Smith, D. & Ryan, M. (2012). Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *Science World Journal* doi: 10.1100/2012/805659.

Smith, D. & Onions, A. (1983). A comparison of some preservation techniques for fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 81:535-540.

Smith, D. & Onions, A. (1994). The preservation and maintenance of living fungi. CAB Internationa. Wallingford.

Snell, J. (1997). General Introduction to Maintenance Methods. Maintenance of Microorganisms and Cells. A manual of Laboratory Methods. Kirsop, B.E. & Doyle, A. (eds).1st ed. London. Academy Pressure, 21-30.

Snell, J. (2001). General Introduction to Maintenance Methods. Maintenance of Microorganisms and Cells. A manual of Laboratory Methods. Kirsop, B.E. & Doyle, A. (eds). 2nd ed. London Academy Pressure, 356- 358.

Stevenson, R. & Jong, S. (1992). Application of Good Laboratory Practice (GLP) to Culture Collections of Microbial and Cell Cultures. *Word Journal Microbiology Biotechnology Edition*, 8:229-232.

Tao, D. & Li, P. (1986). Classification of plant cell cryoprotectants. *Theoretical Biology*, 123:305-310.

Teijon, J. (2006). Bioquímica estructural conceptos y tests. Madrid. Editorial tebar, 216-325.

Tello, J., Vares, F. & Lacasa, A. (1991). Análisis de muestras. En: Manual de laboratorio. Diagnóstico de Hongos, bacterias y nemátodos patógenos, 5:81-82.

Tsai, S. & Lin, C. (2012). Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science. *Brazilian archives of biology and technology*, 55:1516-8913.

Ueno, S., Do, G., Sugara, Y., Kudoh, K. & Higuchi, T. (2004). Three-dimensional measurement of crystals in frozen dilute solution. *International Journal of Refrigeration Netherlands*, 27:302-308.

Van, P. & Thevelein, J. (2003). Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance and biotechnological applications. *Advances in Applied Microbiology*, 53:129-176.

Villalobos, V. & Engelmann, F. (1995). Ex situ servation of plant germplasm using biotechnology. *World journal of microbiology and biotechnology*, 2:375-382.

Wowk, B. (2007). How Cryoprotectants Work. *Cryonics Magazine*, 28:78-95.

ANEXOS

Anexo 1. Porcentaje de crecimiento de las cepas antes y después de criopreservación mantenidos en glicerol, sacarosa y aceite mineral durante 1 mes a -20°C.

Cepas <i>Ascomycetes</i>	% Crecimiento			
	Antes	Después		
	criopreservación	criopreservación		
	Test de viabilidad	Glicerol	Sacarosa	10 Aceite
		10 %	%	mineral
<i>Bionectria sp.</i>	100	80	80	60
<i>Mortierella sp.</i>	100	100	80	100
<i>Trichoderma sp 1.</i>	100	80	60	100
<i>Trichoderma sp 2.</i>	100	80	100	100
<i>Arthrinium kogelbergense.</i>	100	0	0	0
<i>Fusarium sp.</i>	100	100	100	100
<i>Fusarium culmorum.</i>	100	20	0	20
<i>Hypocreales sp 1.</i>	100	80	60	80
<i>Hypocreales sp 2.</i>	100	20	0	0
<i>Trichoderma viride.</i>	100	100	40	0

Anexo 2. Porcentaje de crecimiento de las cepas antes y después de criopreservación mantenidos en glicerol, sacarosa y aceite mineral durante 1 mes a -80°C.

Cepas <i>Ascomycetes</i>	% Crecimiento			
	Antes	Después		
	criopreservación	criopreservación		
	Test de viabilidad	Glicerol 10	Sacarosa 10	Aceite
		%	%	mineral
<i>Bionectria sp.</i>	100	60	80	20
<i>Mortierella sp.</i>	100	20	100	100
<i>Trichoderma sp 1.</i>	100	100	40	40
<i>Trichoderma sp 2.</i>	100	100	80	100
<i>Arthrinium kogelbergense.</i>	100	0	0	0
<i>Fusarium sp.</i>	100	100	100	100
<i>Fusarium culmorum.</i>	100	40	0	20
<i>Hypocreales sp 1.</i>	100	80	80	60
<i>Hypocreales sp 2.</i>	100	100	20	40
<i>Trichoderma viride.</i>	100	100	40	40

Anexo 3. Porcentaje de crecimiento de las cepas antes y después de criopreservación mantenidos en glicerol, sacarosa y aceite mineral durante 1 mes a -20°C y -80°C.

Cepas <i>Ascomicetes</i>	% Crecimiento					
	Antes	Después				
	criopreservación	criopreservación				
	Test de viabilidad	Glicerol	10	Sacarosa	10	Aceite mineral
		%	%	%	%	%
<i>Bionectria</i> sp.	100	40	20	0	0	0
<i>Mortierella</i> sp.	100	100	100	100	100	100
<i>Trichoderma</i> sp 1.	100	0	40	0	0	0
<i>Trichoderma</i> sp 2.	100	20	0	0	0	0
<i>Arthrinium kogelbergense</i> .	100	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.	100	100	100	100	0	0
<i>Fusarium culmorum</i> .	100	0	0	0	0	0
<i>Hypocreales</i> sp 1.	100	0	0	0	0	0
<i>Hypocreales</i> sp 2.	100	60	40	0	0	0
<i>Trichoderma viride</i> .	100	0	0	0	0	0

Anexo 4. Análisis de varianza entre tratamientos de un factor a -20°C durante un mes.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1040	2	520	0,30233	0,742	3,3541
Dentro de los grupos	46440	27	1720			
Total	47480	29				

Anexo 5. Análisis de varianza entre tratamientos de un factor a -80°C durante un mes.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1946,667	2	973,333	0,67732	0,516	3,3541
Dentro de los grupos	38800	27	1437,04			
Total	40746,67	29				

Anexo 6. Análisis de varianza entre tratamientos de un factor entre -20°C y -80°C durante un mes.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2960	2	1480	1,02567	0,372	3,3541
Dentro de los grupos	38960	27	1442,96			
Total	41920	29				