



PARA LA CONSERVACIÓN Y MANTENIMIENTO DE

MANUAL



HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Juntos alimentamos el futuro de México.

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

AUTORES



**Roberto Montesinos Matías
Miguel Angel Ayala Zermeño
Angélica María Berlanga Padilla**

**Colección de Hongos Entomopatógenos
Centro Nacional de Referencia de Control Biológico**

Primera edición 2015
Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad
Agroalimentaria (SENASICA)

Diseño Editorial
Unidad de Promoción y Vinculación - SENASICA

ISBN: 978-968-5384-08-7

Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción, total o parcial de este libro ni el almacenamiento en un sistema informático, ni la transmisión de cualquier forma o cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia, registro u otros medios sin el permiso previo y por escrito de los titulares del copyright.

DIRECTORIO



Lic. Enrique Martínez y Martínez

Secretario de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

M.V.Z. Enrique Sánchez Cruz

Director en jefe del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga

Director General de Sanidad Vegetal

M.C. José Abel López Buenfil

Director del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

M.C. Hugo César Arredondo Bernal

Subdirector de Control Biológico

P R E S E N T A C I Ó N



En los últimos años se ha logrado un avance significativo en el uso de hongos entomopatógenos (HE) como agentes de control microbiano en diversas regiones agrícolas de México, en donde se cuenta con una gran diversidad de organismos con enorme potencial debido a la variabilidad de vegetación y climas a lo largo y ancho del territorio, riqueza biológica que no ha sido explotada en su totalidad. Es por ello que la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CHE - CNRCB) ha iniciado sus actividades básicas con un calendario de exploración nacional para la obtención de aislados de HE de plagas de importancia agrícola, como parte de la primera fase para la implementación de un programa de control biológico.

Esta acción hace necesario contar permanentemente con una colección de cultivos, donde aquellas especies o cepas se puedan preservar de manera permanente, bajo estrictas normas de control de pureza, viabilidad e integridad genómica. Por ello se hace prioritario que la CHE del CNRCB cuente con manuales, catálogos y documentación de apoyo que sean la guía del desarrollo eficiente de las técnicas y métodos de conservación que en ella se practican, con el propósito de operar bajo buenas prácticas de laboratorio, como lo establece la World Federation for Culture Collection (WFCC).

En la búsqueda de cumplir con estándares de calidad internacional en el funcionamiento de la CHE, se presenta este documento como guía para el desarrollo eficiente de las técnicas que en ella se practican. Es importante considerar que las diferentes especies de HE requieren frecuentemente métodos especiales de conservación para asegurar su pureza, viabilidad e integridad genética. Para garantizar lo anterior, los HE deben ser preservados, acorde con los protocolos establecidos en al menos dos métodos. Uno de estos debe ser un método que minimice el riesgo de cambios genéticos, como es la liofilización o bien, la criopreservación a ultra baja temperatura. Los duplicados se deben conservar en refrigeradores separados con suministro eléctrico independiente.

Los objetivos que se persiguen a través de los métodos de conservación incluyen:

- Todas las cepas deben conservarse viables.
- Deben mantener su pureza.
- Durante la conservación de HE, se deben monitorear cuidadosamente los posibles cambios morfológicos en estos. En caso de detectar la pérdida de patogenicidad, se deben realizar bioensayos.

El presente manual describe el procedimiento que se sigue en cada uno de los métodos de conservación implementados en la CHE, los cuales son: aceite mineral, agua destilada, gel de sílice, liofilización y crioconservación a dos temperaturas -70°C y 196°C . Se describe la transferencia periódica, que no es considerada como un método de conservación, ya que su práctica presenta algunas desventajas como el riesgo de cambios morfológicos, la pérdida de la patogenicidad, la virulencia y/o esporulación, esto se debe a que, por este método, no se preserva la integridad genética del hongo. Finalmente, se enumeran las ventajas y desventajas de cada método de conservación.

AGRADECIMIENTOS



Los autores agradecen las valiosas observaciones y contribuciones realizadas al presente documento por los siguientes investigadores:

Dra. María Judith Castellanos Moguel y al Dr. Facundo Rivera Becerril, del Departamento El Hombre y su Ambiente, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Dr. José Francisco Miranda Hernández, del Departamento Biotecnología, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay, Curador de la Colección de Microorganismo del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

M. en C. Hugo César Arredondo Bernal, Subdirector del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB).

Ing. José Carlos Rodríguez Rodríguez, Colección de Hongos Entomopatógenos, Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB).

Í N D I C E



CAPITULO 1. ASPECTOS GENERALES DE LA COLECCIÓN	- 11
1. INFORMACIÓN INSTITUCIONAL	-----11
2. FINANCIAMIENTO	-----12
3. ÁMBITO	-----12
4. OBJETIVOS	-----12
5. OPERACIÓN	-----13
6. PERSONAL	-----14
7. INFRAESTRUCTURA	-----14
8. ACCESIONES	-----16
CAPITULO 2. MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN	----- 17
1. TRASFERENCIA PERIÓDICA	----- 17
2. ACEITE MINERAL	----- 25
3. AGUA ESTÉRIL	----- 30
4. GEL DE SÍLICE	----- 35
5. LIOFILIZACIÓN (CONGELACIÓN-DESECACIÓN)	----- 41
6. CRIOCONSERVACIÓN a -70°C Y -196°C	----- 48
7. MEDIOS DE CULTIVO RECOMENDADOS PARA HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	----- 56

CAPÍTULO 1 ■


ASPECTOS GENERALES DE LA COLECCIÓN



Información institucional

1. INFORMACIÓN INSTITUCIONAL

La CHE del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) es una colección gubernamental dependiente del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) que a su vez depende de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), que ha promovido el uso de la tecnología del control biológico en México durante los últimos 23 años. En la búsqueda de continuar su consolidación como una dependencia gubernamental indispensable para atender los problemas fitosanitarios del país, SENASICA crea la Colección de Hongos Entomopatógenos (CHE) en el año de 2012, como área independiente al Departamento de Hongos Entomopatógenos (HE) en el que estuvo ubicada por 20 años. La colección inició en el año de 1991, con un incipiente número de 40 aislados. Con el tiempo estos se fueron incrementando, hasta el punto que fue necesaria la creación de infraestructura propia. En el área exclusiva para la CHE se aloja este



invaluable recurso genético, donde se han implementado todos los métodos de conservación convencional como medida de respaldo para cada una de las accesiones, además de establecer procesos ordenados para dar manejo adecuado a cada uno los aislados, desde su ingreso hasta su acondicionamiento para su preservación. La CHE del CNRCB, es una colección especializada y de las más numerosas en su tipo en México, su importancia es vital y estratégica para atender los problemas fitosanitarios en beneficio de las generaciones presentes y futuras, estando en concordancia con los planes y políticas del Gobierno Federal, en aspectos de conservación ambiental y protección de la salud pública.

2. FINANCIAMIENTO

El financiamiento que recibe la CHE, proviene de fondos gubernamentales asignados al Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad en Calidad Agroalimentaria.

3. ÁMBITO

Acorde con el ámbito y misión del SENASICA, las actividades de la CHE promueven la sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria, al proveer insumos fitosanitarios para el control biológico como parte del manejo de plagas agrícolas, se beneficia a productores, consumidores e industria, que además contribuye con la conservación ambiental del país.

4. OBJETIVOS

La CHE del CNRCB tiene como metas principales:

- Acrecentar la cantidad y biodiversidad de HE mediante exploración y colecta en campo.
- Asegurar la autenticidad de los aislamientos que componen la colección mediante herramientas actuales de taxonomía basada en los caracteres morfológicos y de biología molecular.




- Conservar la colección de HE manteniendo la pureza, viabilidad e integridad genética durante periodos de tiempo prolongados.
- Caracterizar los aislamientos que conforman la colección para predecir su utilidad como agentes de control biológico.
- Promover el uso de HE en programas de control biológico de plagas agrícolas, para coadyuvar en las actividades de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria de México.
- Generar y fomentar la elaboración de impresos de divulgación acerca del uso de HE.

Además, la CHE brinda el servicio de venta de cepas a través de la página del SENASICA (<http://sistemas1.senasica.gob.mx/hojaAyuda/productos1.jsp>), imparte talleres de capacitación, servicio social y estancias profesionales a nivel licenciatura y posgrado y el depósito de cepas con acceso libre.

5. OPERACIÓN

Las colecciones de cultivo son entidades donde se realizan una serie de actividades de manera ordenada, para cumplir con sus objetivos fundamentales, por lo que requieren de un desarrollo planeado de sus funciones, que permita alcanzar estándares de calidad nacional e internacional en su operación. La CHE es reconocida por el Centro Mundial de Datos de Microorganismos (World Data Centre for Microorganisms, WDCM) como socio institucional (1034) con el acrónimo CHE-CNRCB. La CHE está implementando los lineamientos sobre el establecimiento y funcionamientos de colecciones de microorganismos formulada por la WFCC (membresía 1272). Asimismo, es miembro de la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivo (FELACC) con el número SI-53. La membresía a esta federación, implica la obligación de adoptar los lineamientos enumerados por la WFCC para garantizar una calidad constante y sustentable de los materiales auténticos y la información asociada a



cada accesión. Como parte de estas actividades a cada cultivo de la CHE se le asignó una Identificación Global Única, combinando su acrónimo (CHE-CNRCB) con un número interno, el distintivo se asigna a cada aislado, además este sistema es necesario para ser parte de la red WDCM.

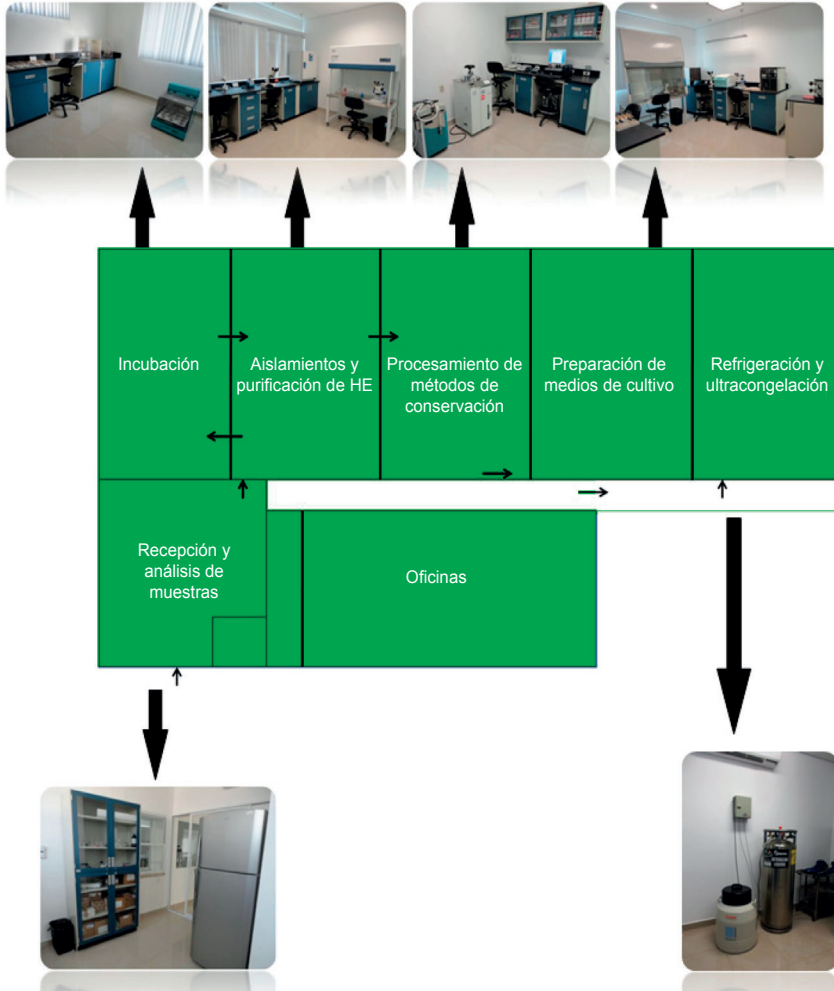
Además de efectuar las buenas prácticas antes mencionadas, la CHE del CNRCB tiene contemplado implementar normas de la serie ISO (International Standard Organization), para consolidarse con estándares de calidad y alcanzar un estatus de referencia a nivel internacional.

6. PERSONAL

La CHE requiere de un trabajo intenso para cumplir con sus propósitos, por lo que cuenta con especialistas para la identificación y autenticación de los HE. Además de la ejecución y validación de métodos de conservación, que permitan preservar las características genéticas de los hongos. La tarea del personal de la CHE, es realizar los cuidados necesarios para asegurar la autenticidad de los microorganismos ahí depositados e incrementar el acervo mediante la exploración y colecta de nuevos especímenes. Para lograr, posteriormente, su correcto aislamiento, purificación e identificación morfológica, mantenimiento, conservación y acondicionamiento para su preservación.

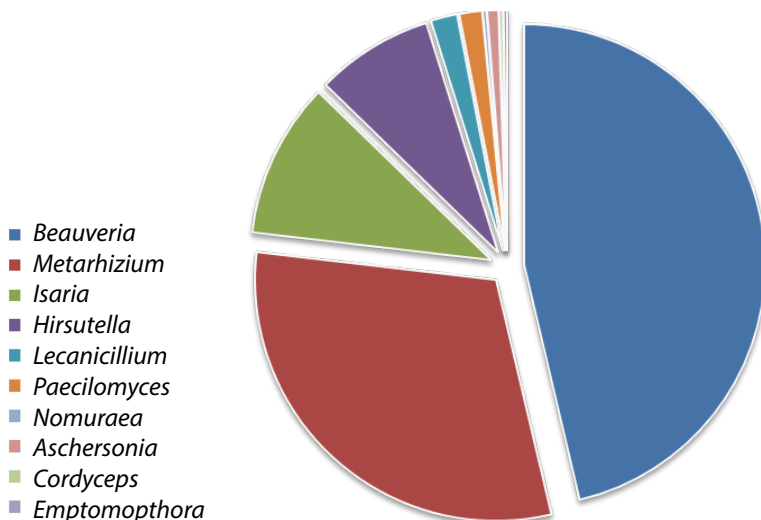
7. INFRAESTRUCTURA

Las CHE cuenta con instalaciones equipadas con tecnología moderna. Su diseño permite llevar un proceso ordenado secuencialmente para la conservación de HE, desde el ingreso de las muestras colectadas en campo, hasta su acondicionamiento para su preservación. La siguiente figura muestra las áreas que conforman el edificio de la CHE.



8. ACCESIONES

La CHE preserva más de 400 aislados fúngicos del orden Hypocreales que a su vez, se divide en tres familias: *Clavicipitaceae*, *Cordycipitaceae* y *Ophiocordycipitaceae* e incluyen los géneros *Aschersonia*, *Beauveria*, *Hirsutella*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium* y *Nomuraea*. La información básica de las cepas que conforman la colección, puede ser consultada en el Catálogo de Especies a través de la página del SENASICA (<http://www.senasica.gob.mx/>). El área de Biología Molecular del CNRCB, trabaja en colaboración con la CHE para lograr la identificación molecular de cada una de las accesiones, considerando los cambios en la nomenclatura que afectan a los HE. Los avances que se logren con la caracterización molecular, se verán reflejados en las actualizaciones periódicas en el Catálogo de Especies. Por el momento, la mayoría de las accesiones de la CHE, se han identificado considerando sus características macro y micro-morfológicas.



Para obtener información complementaria de este apartado, remitase a la siguiente dirección electrónica: <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=6033>.

CAPÍTULO 2 ■

MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN




Trasferencia periódica

1. TRASFERENCIA PERIÓDICA

Introducción

La transferencia periódica en medio de cultivo, es una técnica utilizada frecuentemente para mantener microorganismos a temperatura ambiente o en refrigeración, factor que tiene una estrecha relación con el tiempo de conservación del material biológico (Humber 2012b); además de que depende del crecimiento de las diferentes especies del hongo y sus requerimientos nutricionales, pH, aireación, temperatura, luz y actividad del agua, entre otros factores. La principal ventaja de esta técnica es que no requiere de equipo sofisticado para su utilización (Smith y Onions 1994).

Las cepas de HE que se guardan en forma activa en medio de cultivo en el que han crecido, no pueden permanecer bajo esta condición



indefinidamente, debido a que excretan productos tóxicos del metabolismo, que se acumulan provocando el envejecimiento y muerte celular, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco. Es por ello que esta actividad, es la técnica menos recomendable para conseguir la estabilidad genética, puesto que el hongo se encuentra en crecimiento constante, lo que genera alternancia de generaciones y, al cabo del tiempo, las células que se mantienen serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características (Snell 1984; Humber 2012b).

En caso de utilizar esta técnica, es conveniente retardar el envejecimiento y alargar los periodos entre transferencias. Esto se puede conseguir disminuyendo la cantidad de inóculo, reduciendo la proporción de algunos nutrimentos en el medio de cultivo, y almacenando los cultivos entre 4°C y 8°C. Algunos inconvenientes que tiene la transferencia periódica es la contaminación por otros microorganismos entre resiembras, además de la posibilidad de entrada de ácaros en los medios de cultivo (García-López y Uruburu-Fernández 2001).

En el caso de los HE, la transferencia periódica en medios de cultivo artificial puede ocasionar cambios en su morfología como disminución o pérdida de la esporulación y la virulencia, y no hay manera de predecir si las características de invasividad y procesos de crecimiento del hongo también son afectados (Butt *et al.* 2006). Por lo que los cultivos deben monitorearse cuidadosamente para detectar posibles cambios morfológicos y realizar bioensayos periódicamente para reactivar la virulencia (Humber 2012b).

Durante los procesos de mantenimiento, se corre el riesgo de la pérdida de identidad del microorganismo (nombre o designación del cultivo) después de cierto número de transferencias; además del riesgo de contaminación, la posible inoculación con el microorganismo equivocado cuando se realiza la transferencia de una serie de cepas; el peligro de pérdida del cultivo, sobre todo cuando se trabaja con microorganismos que requieren nutrimentos específicos y no se realizan a tiempo las transferencias periódicas a medios frescos, así como la posibilidad de



que ocurra deshidratación del medio de cultivo (Gato-Cárdenas 2010). Además, cuando se manipula un gran número de microorganismos, el trabajo es continuo y se requiere un espacio considerable para el almacenamiento (Jenkins y Grzywacz 2003). La ventaja de esta técnica es que pueden mantenerse prácticamente todas las especies de hongos.


Todos los métodos empleados para conservar o preservar la viabilidad y las características genéticas de los hongos, se basan fundamentalmente en la reducción o suspensión de su actividad metabólica (Mier *et al.* 2005). En los HE, la transferencia periódica ocasiona una atenuación de la virulencia (Butt *et al.* 2006), por lo que, como medida precautoria se recomienda evitar las resiembras frecuentes debido a la aparición de formas no esporulantes, mutaciones o alteraciones morfológicas de la colonia que en muchas ocasiones son originadas por elementos extracromosómicos como los micovirus (Melzer *et al.* 1998; Roberts y St. Leger 2004).

Método

Preparación de tubos con medio de cultivo inclinado y prueba de esterilidad

La transferencia periódica se realiza en tubos con medio de cultivo inclinado. Entre sus principales ventajas es que permite detectar la presencia de contaminantes, además de evitar la desecación rápida del medio.

La preparación de medios de cultivos a utilizar varían de acuerdo con la especie de hongo que se desea propagar. Los tubos con medio de cultivo se esterilizan generalmente en autoclave a 121°C y 15 lbs de presión durante 15 min (condiciones estándar), enseguida se colocan en posición inclinada (45°) procurando que el medio quede aproximadamente dos centímetros por debajo del tapón de algodón o de la tapa de baquelita, para evitar una posible contaminación. Cada lote de medio de cultivo, una vez que se prepara y esteriliza, se etiqueta con el nombre correspondiente. En caso de que se trabaje con medios de cultivo distintos, es imprescindible indicar el número de lote y la fecha de elaboración. El tiempo de vida del medio preparado dependerá de su propia naturaleza, de la temperatura de conservación, de las condiciones ambientales y de la hermeticidad de los recipientes utilizados.



Previo al uso del medio de cultivo, se registra el control de esterilidad, considerando los siguientes datos: fecha de preparación, nombre del medio de cultivo y proceso de esterilización que se siguió. Se deja reposar el cultivo por 48 h a 25°C en campana de flujo laminar, como prueba de esterilidad inicial. Posterior a la inoculación del microorganismo, se incuba medio de cultivo sin inóculo, como control negativo y prueba de esterilidad final. Se recomienda seguir siempre este proceso de control de esterilidad, antes y durante la incubación del hongo.

Lo más recomendable es preparar sólo la cantidad que se van a emplear, aunque en muchos casos, una parte del medio preparado se utiliza y el resto se guarda.

Inoculación en medio de cultivo superficial

La mayor parte de los hongos que constituyen la colección, son cultivos poliespóricos. Para propósitos de mejoramiento, en algunos hongos se trabaja con cultivo monospóricos. Para ambos casos, se sigue la siguiente metodología: con un asa micológica, se inocula por estría o con una suspensión de conidios fresca, la superficie del cultivo nuevo (Inglis *et al.* 2012). Para los géneros *Aschersonia*, *Hirsutella* y *Lecanicillum*, la inoculación se realizan mediante transferencia de segmentos de micelio, conidios o ambos. Se ha reportado que los conidios son la forma más conveniente para la propagación de HE (Humber 2012b).

El material se incuba a 27°C hasta su esporulación, o de acuerdo a los requerimientos del organismo sembrado. Para detectar posibles contaminantes, debe observarse el crecimiento del hongo durante el periodo de incubación. También es necesario corroborar estas características morfológicas de la especie con el apoyo de claves taxonómicas descritas por Humber (2012a), y llevar un registro del desarrollo del hongo transferido, hasta que haya alcanzado el crecimiento óptimo.

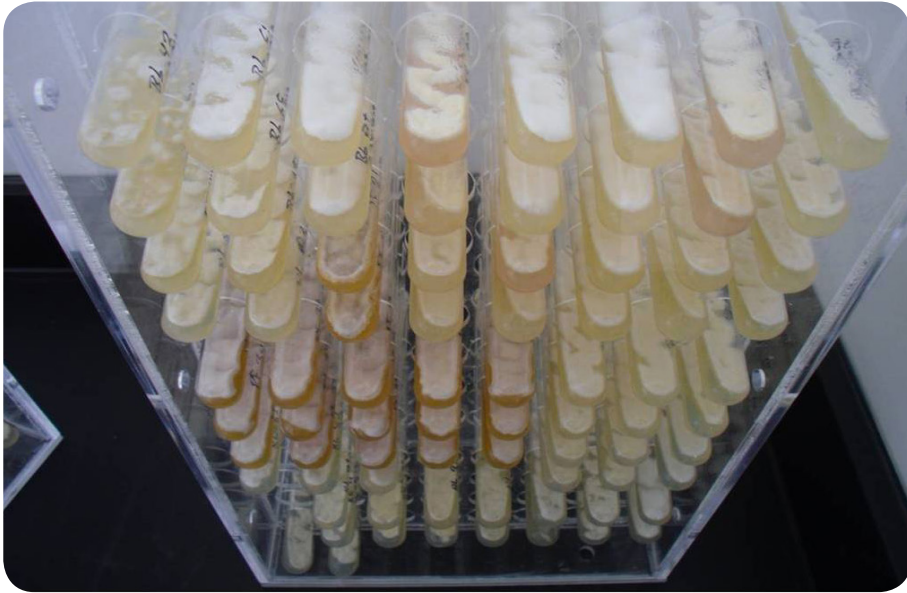


Figura 1.1 Cultivo de hongos entomopatógenos en tubos con agar inclinados.

Almacenamiento

El material se conserva en refrigeración, a una temperatura de entre 4 y 8°C, para disminuir el metabolismo de los hongos, por lo que su crecimiento es muy limitado y la necesidad de realizar una próxima resiembra se extiende en tiempo.

Transferencia a medio de cultivo fresco

El tiempo de almacenamiento del HE, manteniendo la viabilidad, está determinado por el género y especie. En el caso de los géneros como *Aschersonia*, *Hirsutella*, *Lecanicillium* y *Nomuraea* se debe realizar la transferencia a medio de cultivo fresco cada dos a tres meses; para *Isaria* hasta seis meses; los géneros como *Beauveria* y *Metarhizium* pueden permanecer viables hasta por un año, aunque se recomienda como máximo seis meses para mantener el cultivo saludable (Eken 2011). La principal desventaja de la transferencia periódica, es que no se logra preservar la integridad genética del microorganismo (Humber 2012).



Materiales y Equipos necesarios para este método

- Tubos o viales de vidrio
- Asas micológicas o bacteriológicas
- Medios de cultivo
- Agua destilada
- Matraces
- Balanza analítica
- Espátulas
- Autoclave
- Parrilla caliente con agitador
- Campana de flujo laminar

Cuadro 1.1 Ventajas y desventajas de la transferencia periódica.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Tecnología simple	Posibles cambios en las características fenotípicas y pérdida de la patogenicidad
Permite la observación continua del fenotipo	Utilización continua de muchos materiales y mano de obra
Algunos hongos pueden mantener su viabilidad por varios años, siempre que sean manejados por un especialista	Riesgo de contaminación por ácaros u otros microorganismos
Recomendable para colecciones pequeñas o ceparios que requieren el hongo frecuentemente	Cambio de la clave del hongo
La recuperación es sencilla	

Literatura citada

Butt, T.M., Wang, C., F.A. Shah & R. Hall. 2006. Degeneration of entomogenous fungi. p. 213-226. In: J. Eilenberg & H.M.T. Hokkanen (eds). Progress in biological control. Vol. 2. An ecological and societal approach to biological control. Amsterdam: Springer Netherlands. 322 p.



- Eken, C. 2011. Isolation, identification and preservation of entomopathogenic fungi. p. 1-28. In: Borgio J.F., Sahayaraj K., Susurluk I. A. (eds). Microbial Insecticides principles and applications. Nova Science Publishers, Inc. 492 p.
- García-López, M.A. & F. Uruburu-Fernández. 2001. La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia, España. 46100 Burjassot (Valencia). Obtenida en la red mundial el 17 de febrero del 2014, http://www.uv.es/cect2/87_Conseervacion_cepas_microbianas.
- Gato-Cárdenas, Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. Fitosanidad 14(3): 189-195.
- Humber, R.A. 2012a. Identification of entomopathogenic fungi, p. 151-187. In: Lacey L.A. (ed). Manual of techniques in insect pathology. 2a Edition. Academic Press. 484 p. Yakim, Washington, USA.
- Humber, R.A. 2012b. Preservation of entomopathogenic fungal cultures, p. 317-328. In: Lacey L.A. (ed). Manual of techniques in insect pathology. 2a Edition. Academic Press. 484 p. Yakim, Washington, USA.
- Inglis, G.D., J. Enkerli & M.S. Goettel. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales, p. 189-253. In: Lacey L.A. (ed). Manual of techniques in insect pathology. 2a Edition. Academic Press. 484 p. Yakim, Washington, USA.
- Jenkins, N.E. & D. Grzywacz. 2003. Towards the standardization of quality control of fungal and viral biocontrol agents. p. 247-264. In: van Lenteren J.C. (e.d.). Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures. CAB International, Wallingford, London, UK.



- Melzer, M.J, & M. J. Bidochka. 1998. Diversity of double-stranded RNA viruses within populations for fungal growth and virulence. *Mycologia* 90: 586-594.
- Mier, T., Toriello, C., M.A. Ayala-Zermeño & H. Navarro-Barranco. 2005. Conservación de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas. CUADERNO 51. CBS UAM-Xochimilco. 39 p. Distrito Federal, México.
- Roberts, D.W. & R.J. St. Leger. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology* 54:1-70.
- Smith, D., & A.H.S. Onions. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. 2a. Edition. International Mycological Institute. CAB International, UK. 122 p. Wallingford, Oxon, UK.
- Snell, J.S. 1984. General Introduction to maintenance methods, pp. 11-21. In: Kirsop B.E & J.J.S. Snell. (Eds). Maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods. Academic Press Inc. Londres, UK. p 207.



2. ACEITE MINERAL

Introducción

Este método de conservación consiste en cubrir el cultivo del hongo con aceite mineral para impedir la evaporación del agua contenida en el medio de cultivo y evitar el incremento de presión osmótica por concentración de los solutos, que produciría alteraciones importantes en el hongo (Rico *et al.* 2004), además limita la presencia de oxígeno disponible. Por este método los hongos pueden mantenerse viables por más de 25 años a intervalos de temperatura de 4°C (Sharma y Smith 1999). Este método es comúnmente utilizado para hongos que no toleran la liofilización, que presentan escasa esporulación y cuando la ultracongelación no es una opción, debido a su alto costo (Humber 2012).

Existen referencias sobre el mantenimiento de la viabilidad en el 81% de cultivos que permanecieron cubiertos con aceite mineral durante 32 años a partir de la fecha inicial de conservación, entre ellos el género *Lecanicillium* (Smith y Onions 1994). Little y Gordon (1967) también reportaron la conservación de la viabilidad de tres aislados de *Beauveria* sp. después de haber permanecido durante 12 años en aceite mineral.

Entre las ventajas de este método, es que se tiene una viabilidad prolongada de la mayoría de las especies, así como la disminución de contaminación por ácaros. Además, no se requiere equipo especializado para la conservación. Entre las principales desventajas, está la aparición de contaminación por otros hongos, así como el retraso en el crecimiento de las cepas recuperadas (Mier *et al.* 2005).



Método

- 1.- Utilizar viales de vidrio de 12 mL de 18 x 65 mm con tapón de baquelita y agregar 3 mL de medio de cultivo, esterilizar e inclinar en un ángulo aproximado de 45° (Fig. 2.1).
- 2.- Sembrar por estría el hongo. Incubar a 25°C, hasta alcanzar esporulación (Fig. 2.2).
- 3.- Esterilizar el aceite mineral (densidad a 25°C, 0.848 g/mL y viscosidad 83.5 SUS) a 120°C por 15 min. Permitir que transcurran entre 24 a 48 h, y realizar una segunda esterilización. Llevar el aceite al horno (180°C, por una h), para eliminar la humedad retenida (Smith *et al.* 2001).
- 4.- En condiciones asépticas, cubrir los cultivos con 8 mL de aceite mineral, utilizando puntas estériles de 10 mL. Se debe corroborar que el nivel de aceite quede un centímetro por encima del cultivo (Fig. 2.3).
- 5.- Cerrar el vial de vidrio con el tapón de baquelita y sellar con papel Parafilm®.
- 6.- Etiquetar y almacenar en gradillas en posición vertical a temperatura ambiente (Fig. 2.4).
- 7.- Después de una semana de almacenamiento, es necesario realizar una prueba de control de calidad del material conservado, siguiendo la metodología descrita para su recuperación.

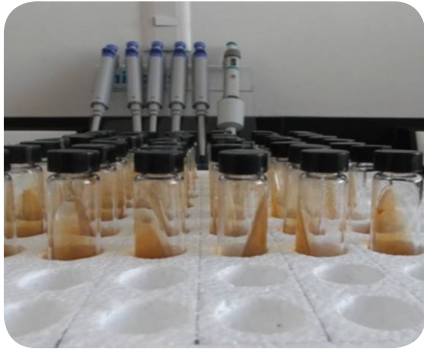


Figura 2.1 Viales con medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud y extracto de levadura.

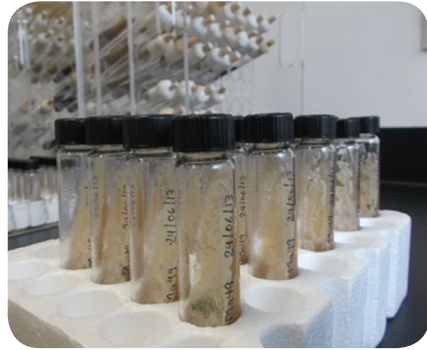


Figura 2.2 Hongos cultivados en viales de vidrio.

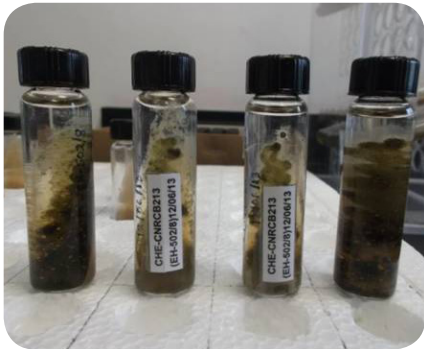


Figura 2.3 Viales con cultivos cubiertos con aceite mineral para su conservación.



Figura 2.4 Almacenamiento en gradillas para su ubicación en anaqueles.

Recuperación de cultivos

- 1.- A partir de un vial que contenga el hongo, retirese completamente el aceite, escurriendo el exceso del mismo.
- 2.- Añadir un volumen de 3 mL de Tween 80 al 0.05%. Con un asa micológica estéril, desprender los conidios y parte del micelio, y agítese en vórtex.
- 3.- De la suspensión obtenida, tomar una alícuota de 100 μ L y sembrar en cajas de Petri con medio de cultivo. Esparcir con una varilla doblada.
- 4.- Verificar que el cultivo se encuentre viable y libre de contaminación. Una vez que madure, se deben confirmar las características propias del HE (Fig. 2.5).



Figura 2.5 Cultivos de *Metarhizium anisopliae* (a), *Isaria fumosorosea* (b) y *Beauveria bassiana* (c) recuperados a partir de viales conservados durante seis meses en aceite mineral.

Cuadro 2.1 Ventajas y desventajas de la conservación en aceite mineral.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Económico, tecnológicamente sencillo, recomendable para laboratorios con recursos limitados	Se requiere considerar el espacio disponible, ya que los tubos deben permanecer en posición vertical
Algunos hongos permanece viables por tiempos prolongados, en especial aquellos que son susceptibles a otros métodos de conservación	Ausencia de control ante la posible contaminación por otros hongos



Literatura citada

- Litte, G. N. & M. A. Gordon. 1967. Survival of fungus cultures maintained under mineral oil for twelve years. *Mycologia* 59: 733-736.
- Mier, T., Toriello, C., M. A. Ayala-Zermeño & H. Navarro-Barranco. 2005. Conservación de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas. CUADERNO 51. CBS UAM-Xochimilco. 39 p. Distrito Federal, México.
- Rico, M., C. V. Piattoni, C. González, R. Monela, M. G. Latorre, M. C. Lurá. 2004. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *Revista FABICIB* 8:163-172.
- Sharma B. & D. Smith. 1999. Recovery of fungi after storage for over a quarter of a century. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15: 517-519
- Smith, D., & A. H. S. Onions. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. 2a. Edition. International Mycological Institute. CAB International. 122 p. Wallingford, UK.
- Smith, D., M. J. Ryan & J. G. Day. 2001. The UK national culture collection (UKNCC) biological resource: properties, maintenance and management. *Pineapple Planet*. 382p. Surrey UK.

3. AGUA ESTÉRIL

Introducción

El acelerado progreso en materia de conservación de microorganismos, no ha impedido que la conservación en agua destilada estéril siga teniendo un lugar preferencial por ser un método de bajo costo, sencillo y seguro, capaz de garantizar la viabilidad de los cultivos fúngicos por periodos prolongados (Malik y Hoffmann 1993). Este método es útil especialmente para microorganismos que no pueden ser liofilizados como los Entomophthorales (López Lastra *et al.* 2002), o aquellos hongos que no toleren la ultracongelación.

Cuadro 3.1 Viabilidad (meses) de las diferentes especies de hongos entomopatógenos conservados en agua destilada comparada con otros métodos de conservación (López-Lastra *et al.* 2002).

Especies fúngicas		Agua	Aceite mineral	Gel de sílice	Congelación a -20°C	Congelación a -80°C
Clase Hyphomycetes	<i>I. fumosorosea</i>	18	18	0	12	18
	<i>Hirsutella thompsonii</i>	18	18	0	12	18
	<i>Nomuraea rileyi</i>	18	3	3	12	6
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	18	18	0	18	18
	<i>Lecanicillium lecanii</i>	18	18	6	12	12
Clase Zygomycetes Orden Entomophthorales	<i>Conidiobolus thromboides</i>	18	18	0	18	18
	<i>Zoophthora radicans</i>	18	3	0	0	18
Clase Trichomycetes	<i>Smittium culisetae</i>	18	18	0	0	0
Clase Oomycetes	<i>Leptolegnia champmanii</i>	18	18	0	0	0



Algunos hongos patógenos logran sobrevivir en agua hasta 20 años, aunque otros pierden la viabilidad en el corto plazo (Nakasone *et al.* 2004). En un estudio realizado por López-Lastra *et al.* (2002) se confirmó la utilidad de este método para nueve especies de HE que, después de 18 meses, se lograron recuperar todas las cepas (Cuadro 3.1).

Sin embargo, en un estudios realizados por Borman *et al.* (2006), proponen utilizar como método principal de conservación, la liofilización o nitrógeno líquido (-196°C); y el método de agua destilada como un segundo método, y de aquellos hongos que no sean compatibles al desecado o a la ultracongelacion.

Método

- 1.- Utilizar hongos maduros crecidos en cajas de cultivo (Fig. 3.1).
- 2.- Esterilizar en condiciones estándar (120°C, 15 lbs de presión por 15 min) viales de plástico de 1.8 mL con 1.3 mL de agua destilada (cuatro réplicas por hongo).
- 3.- En condiciones de asepsia, realizar cortes del cultivo fúngico con un popote estéril, para obtener bloques circulares de la colonia con el tamaño adecuado para ser introducidos en los viales (Fig. 3.2).
- 4.- Transferir de dos a cuatro bloques a cada vial con agua destilada con una aguja de disección, verificar que queden sumergidos en el agua (Fig. 3.3). Cerrar los viales.
- 5.- Etiquetar y colocar en posición vertical en cajas de cartón con divisiones y almacenar a 4°C (Fig. 3.4).
- 6.- Realizar el control de calidad después de la refrigeración.

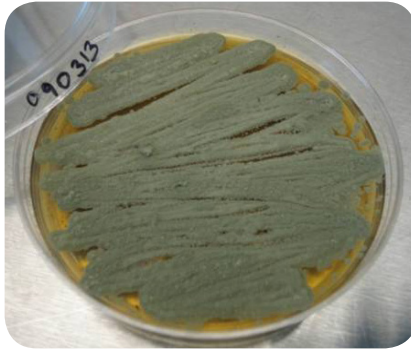


Figura 3.1 Cultivos maduros.

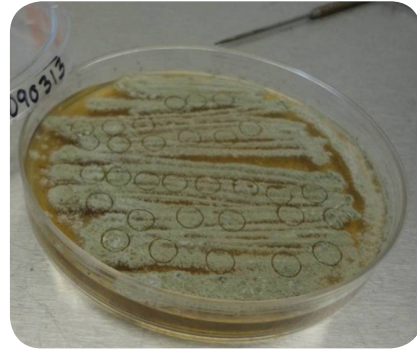


Figura 3.2 Obtención de bloques esporulados con popotes estériles.

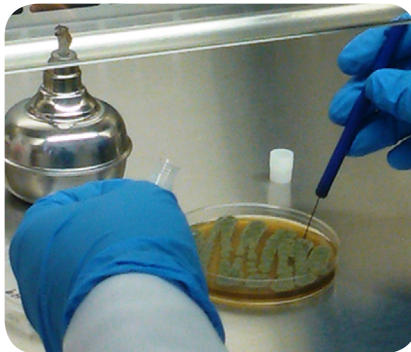


Figura 3.3 Transferencia de tres a cuatro bloques de crecimiento fúngico a cada vial con agua destilada estéril.

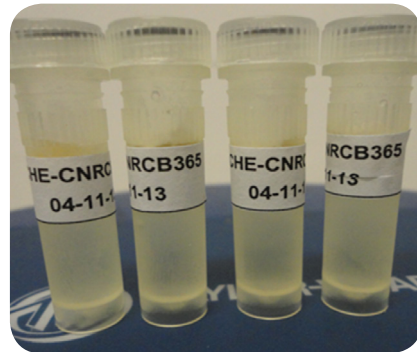


Figura 3.4 Viales etiquetados para su almacenamiento a 4°C.

Recuperación de cultivos

- 1.- A partir de viales de plástico almacenados por una o dos semanas, llevar los bloques de agar esporulados con un asa micológica a medio de cultivo fresco, teniendo en cuenta los requerimientos nutrimentales del hongo.
- 2.- Durante el desarrollo del HE verificar la ausencia de contaminación. Una vez que el cultivo alcance su maduración (2-6 semanas,



dependiendo de la especie), monitorear las características de viabilidad y aspectos morfológicos. Si hay cambios en los fenotipos de crecimiento, se descarta y se vuelve a procesar, procurando conservar el hongo en su estado original.

Cuadro 3.2 Ventajas y desventajas de la conservación en agua destilada.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Ecomómico, tecnológicamente sencillo (no requiere equipo especializado).	Se requiere verificar continuamente el nivel de agua requerido.
Ocupa poco espacio (Viales pequeños)	Algunos hongos pierden su viabilidad en un lapso corto de tiempo.
Recomendable para preservar microorganismos a mediano plazo (2 - 5 años).	Se deben controlar posibles agentes contaminantes.

Literatura citada

- Borman, A.M., Szekey, A., C.K. Campbell & E.M. Johnson. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* 161: 361-368.
- Clark, G. M. & W. Dick. 1974. Long-term storage and viability of aquatic Oomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 63: 611-612.
- López-Lastra, C.C., A.E. Hajek & R.A. Humber. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany* 80: 1126-1130.



Malik, K.A., & P. Hoffmann. 1993. Long-term preservation of yeast culture by liquid drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 372.

Nakasone, K.K., S.W. Peterson & S.C. Jong. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures, p 37-47. In: Mueller G.M., G.F. Bills & M.S. Foster (eds). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. USA Elsevier Academic Press. p 777. Burlington, MA, USA.



4. GEL DE SÍLICE

Introducción

La mayoría de las esporas e hifas de los hongos poseen bajo contenido de humedad, además tienen la capacidad de sobrevivir a periodos de deshidratación, reactivándose cuando las condiciones de humedad han sido restablecidas. Algunos de los métodos de conservación de hongos microscópicos, se basan en la desecación por deshidratación de las células, como es la liofilización y el gel de sílice, propiciando que mantengan su actividad metabólica al mínimo, lo que les permite sobrevivir por períodos prolongados de tiempo (Smith y Onions 1994).

El método de conservación de gel de sílice, es útil para la mayoría de los hongos conidiales, permitiendo que estos mantengan su viabilidad. Por este método, en el caso de algunas especies de HE, es posible mantener su viabilidad por más de 10 años (Mier *et al.* 2005; Berlanga-Padilla *et al.* 2013). La principal ventaja de este método reside en su sencillez y bajo costo, ya que no requiere de equipo sofisticado para su procesamiento, y mantiene la viabilidad y la pureza de los cultivos, además de las características morfológicas, genéticas y de virulencia (Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez 2003). Asimismo se evita la contaminación por ácaros, y a partir de un mismo vial se pueden obtener varios cultivos. Las desventajas de este método consisten en que está limitado a los hongos conidiales, por lo que no es aplicable a hongos levaduriformes, además de que favorece la introducción de contaminantes al tomar muestras de los especímenes conservados.

El procedimiento es considerado como un método de conservación a largo plazo, que consiste en suspender en leche descremada (5-7%) una concentración de conidios que son mezclados cuidadosamente con cristales de gel de sílice. Los frascos conteniendo los cristales, se enfrían previamente y durante el proceso de conservación, lo que evita que el calor generado durante la mezcla inactive la viabilidad del hongo.



Método

Uno o dos días previos al procesamiento de conservación:

- 1.- Esterilizar una solución de leche descremada Svelty® al 5% (5 min a 121°C). Utilizar 10 mL por cepa, contenidos en tubos de vidrio con tapón de baquelita.
- 2.- Preparar viales de vidrio (50 x 16 mm) introduciendo, hasta un tercio de su capacidad, cristales de gel de sílice anhidro (grado 40, malla 6-12, sin indicador). Esterilizar en seco en un horno a 180°C durante 2 h (Fig. 4.1 a).
- 3.- A cada cultivo esporulado, agregar la solución de leche descremada Svelty® (5%). Con un asa micológica desprender las esporas sobre la superficie del cultivo. Transferir la suspensión a tubos Falcon™ de 15 mL, dejándola reposar por 12 h a 4°C (Fig. 4.1 b).

Proceso de conservación

- 1.- En condiciones estériles, se inoculan los cristales de gel de sílice (previamente refrigerados y colocados en un recipiente con hielo para mantenerlos fríos), agregando por goteo un mL de la suspensión de conidios sobre las paredes del tubo. Inclinar los tubos con el fin de que el inóculo cubra el mayor volumen posible (Fig. 4.1 c).
- 2.- Los tubos con gel de sílice, inoculados con la suspensión de conidios en leche, se mantienen a temperatura ambiente por una semana. Posteriormente, se colocan en un desecador, agitándose periódicamente hasta eliminar el exceso de humedad, y los cristales ya se puedan separar. Los viales deben almacenarse a 4°C (Berlanga-Padilla *et al.* 2012).
- 3.- Para verificar que el proceso de conservación haya sido exitoso, después de una semana de almacenamiento, se realiza el control de calidad, el cual consiste en verificar la viabilidad y pureza del material procesado.

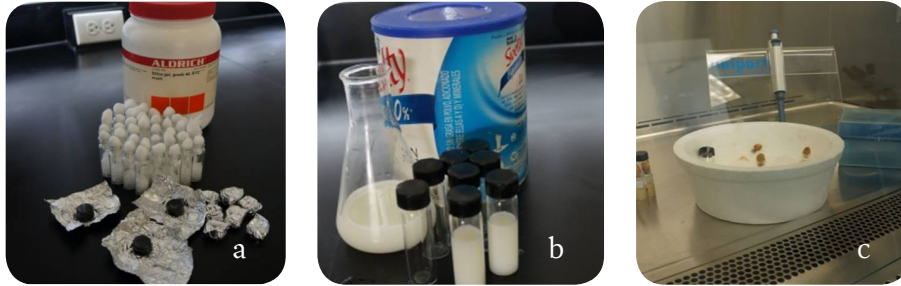


Figura 4.1 Material necesario para conservar hongos en gel sílice (a) y (b), inoculación en condiciones de baja temperatura (c).

Recuperación de cultivos

Para reactivar el material almacenado, es recomendable sembrar algunos cristales en medio de cultivo sólido en condiciones estériles. Posterior a la siembra, se debe verificar la viabilidad, ausencia de contaminación, esporulación y, en general, las características fenotípicas propias del aislado de acuerdo a su género y especie (Fig. 4.2).

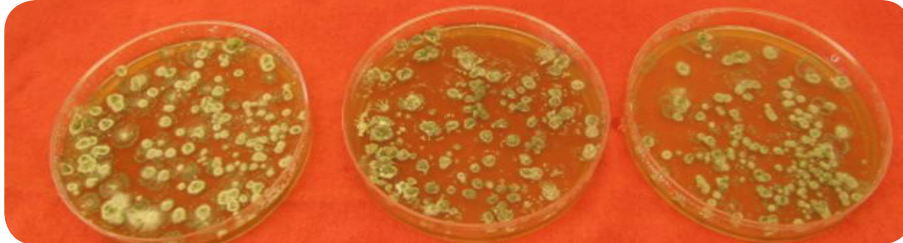


Figura 4.2 Desarrollo de *Metarhizium anisopliae* después del proceso de conservación en gel de sílice.

En el año 2001 se inició la conservación, en gel de sílice, de algunos aislados de la Colección de Hongos Entomopatógenos del CNRCB, como alternativa al traspaso en medio de cultivo. En el año 2012, se evaluó el método de conservación de 176 aislados almacenados entre 5 a 10 años, principalmente de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*, los resultados se muestran en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Número de aislados y tiempo de conservación en gel de sílice de cepas de *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* (Berlanga-Padilla et al. 2012).

Hongo	No. de aislados	Inicio de conservación	Tiempo de conservación (años)
<i>Beauveria</i>	04	2002	10
	09	2003	9
	17	2004	8
	07	2005	7
	45	2007	5
	Total = 82		
<i>Metarhizium</i>	07	2001	11
	04	2002	10
	22	2003	9
	01	2004	8
	15	2006	6
	13	2007	5
Total = 62			
<i>Isaria</i>	22	2004	8
	10	2005	7
Total = 32			

De los 176 aislados conservados en gel de sílice, el 87.5% se mantuvieron viables (Cuadro 4.2). Se observó un crecimiento estable de los aislados de *Beauveria* y *Metarhizium* en términos de fenotipos de crecimiento, después de su conservación por 5 a 10 años; en cambio, de los 32 aislados de *Isaria* evaluadas, sólo 20 estaban viables, lo que representa el 62.5% de aislados recuperados para este género, además, el aspecto del crecimiento fue irregular, comparado con *Beauveria* y *Metarhizium*.



Cuadro 4.2. Viabilidad de hongos entomopatógenos conservados en cristales de gel de sílice (Berlanga-Padilla *et al.* 2012).

Hongo	Aislados viables/aislados conservados	Aislados viables (%)
<i>Beauveria</i>	82/82	100
<i>Metarhizium</i>	62/62	100
<i>Isaria</i>	20/32	62.5
	Total de conservados = 176 aislados	Total = 87.5 %

Materiales y Equipos

Materiales

- Cultivo esporulado de HE en tubos inclinados
- Viales de vidrio 16 x 50 mm con tapón de rosca
- Cristales de gel de sílice grado 40, sin colorante
- Leche descremada
- Micropipetas (100-1000 μ L)
- Puntas azules
- Contenedor de polipropileno (hielera) con hielo seco

Equipos

- Estufa eléctrica que alcance la temperatura de 180°C
- Campana de flujo laminar
- Desecador

Cuadro 4.3. Ventajas y desventajas de la conservación en gel de sílice.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Tecnología sencilla y económica	El éxito de este método, a largo plazo, depende de cerrar correctamente los viales Durante la recuperación se corre el riesgo de introducir contaminantes
La mayoría de los hongos esporulantes se conservan exitosamente	
De un vial se puede obtener inóculo varias veces	
Se puede almacenar a temperatura ambiente o a 4°C	
No hay contaminación por ácaros, puesto que no sobreviven a las condiciones de baja humedad	

Literatura citada

Berlanga-Padilla, A. & V.M. Hernández-Velázquez. 2003. Conservación de hongos entomopatógenos en gel de sílice. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-23. 4 p. Tecomán, Colima, México.

Berlanga-Padilla, M.A., R. Montesinos-Matías & M.A. Ayala-Zermeño. 2012. Estabilidad de hongos entomopatógenos conservados en gel de sílice, pp 32-35. In: E. Sansinenea-Royano, J.L. Zumaquero-Rios & M.C. Del Rincón-Castro (eds.), Memoria del XXXV Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Noviembre, 2012, Puebla, Puebla, México.

Humber, R.A. 2012. Preservation of entomopathogenic fungal cultures, p. 317-328. In: Lacey L.A. (ed). Manual of techniques in insect pathology. 2a Edition. Academic Press. 484 p. Yakim, Washington, USA.

Mier, T., Toriello, C., M.A. Ayala-Zermeño & H. Navarro-Barranco. 2005. Conservación de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas. CUADERNO 51. CBS UAM-Xochimilco. 39 p. Distrito Federal, México.

Smith, D., & A.H.S. Onions. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. Second Edition. International Mycological Institute. CAB International, UK. 122 p. Wallingford, Oxon, UK.



5. LIOFILIZACIÓN (CONGELACIÓN-DESECACIÓN)

Introducción

En la actualidad, los métodos de liofilización y nitrógeno líquido, se consideran como los más indicados para conservar germoplasma de hongos, por lo tanto, son las principales estrategias que emplean la mayoría de las instituciones que establecen colecciones de cultivo o ceparios. El método de congelación y desecación al vacío, a temperaturas de -50°C , conserva las características de los hongos conidiales en estado de vida latente, durante periodos prolongados (Mier *et al.* 2005). Para la preservación de la viabilidad y la virulencia de conidios de *B. bassiana*, Feng *et al.* (1994) recomiendan el secado-congelado como una de las técnicas más apropiadas.

Las principales desventajas de la liofilización consisten en que no todos los hongos sobreviven a las condiciones extremas del proceso; además de ser una técnica de costo elevado, debido a los requerimientos de infraestructura y equipo (Smith y Onions 1994; Mier *et al.* 2005). Por ejemplo, *Hirsutella thompsonii* y especies pertenecientes al Orden de los Entomophthorales, demostraron ser muy sensibles a la liofilización, por lo que no pudieron ser conservados por medio de esta técnica (Mier *et al.* 2005). Estas observaciones coinciden con lo reportado por Smith y Onions (1994) para el género *Entomophthora*. La liofilización es eficaz para aquellos hongos que presentan abundante esporulación, ubicados principalmente en la división de Ascomicetos y Basidiomicetos. No suele ser útil para hongos con gran volumen vacuolar en sus células, como los Oomycetes y Entomophthorales (Fig. 5.1).

Para un amplio rango de HE, la transferencia periódica en medio de cultivo y la práctica de algunos métodos de conservación de mediano plazo, crea degeneración fenotípica y atenuación de la virulencia (Butt *et al.* 2006); por lo que es recomendable utilizar un esquema de lote semilla como estrategia para mantener la estabilidad genética de los microorganismos (Simione 2009). Esta práctica permite manejar un lote

de trabajo y un stock, que además asegura disponer del cultivo original (poliespórico) en el futuro. En la CHE se practica esta estrategia para los métodos de liofilización y criopreservación en nitrógeno líquido.

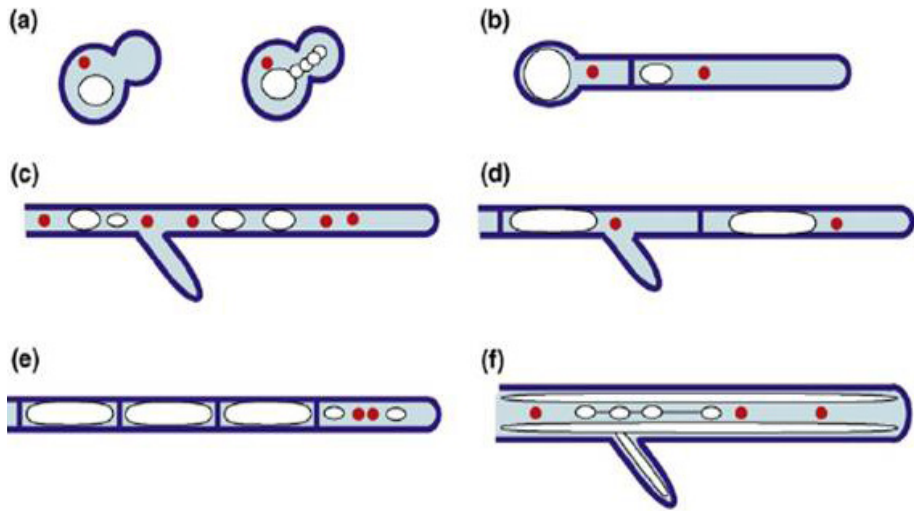


Figura 5.1. Volumen variable de vacuolas en hongos filamentosos y levaduras (círculos blancos) (Veses *et al.* 2008).

Método

- 1.- Sembrar el hongo en un medio de cultivo que permita alcanzar una esporulación abundante, producidos preferentemente en tubos con agar inclinado.
- 2.- Obtener suspensiones conidiales en los tubos de cultivo, adicionado 5 mL de Tween 80 al 0.05%.
- 3.- Decantar la suspensión en tubos Falcon® de 15 mL y llevar el volumen a 12 mL con Tween 80 al 0.05%.



4.- Centrifugar a 4000 rpm durante 7 min, decantar la muestra para retirar el Tween 80. Tener la precaución de no remover o perder la pastilla de conidios.

5.- Para cada una de las pastillas de conidios contenidas en los tubos Falcon™, añadir 4 mL de agua destilada estéril, centrifugar a 4000 rpm durante 7 min. Repetir este proceso dos ocasiones más.

6.- Previo a la cosecha de conidios, preparar leche descremada al 10% (Svelty®) y esterilizar en autoclave a 121°C por 5 min. Añadir un volumen de 2 mL de leche a cada una de las pastillas de conidios contenidas en cada tubo Falcon™. Decantar las muestras en viales de vidrio con tapón de goma (Berlanga-Padilla *et al.* 2003).

7.- Dejar reposar los viales en refrigeración por 12 h para permitir la difusión del crioprotector al interior de las células (proceso de curado).

8.- Colocar cada una de las muestras en un ultracongelador de rodillos con etanol a -50°C (20 min) (Figs. 5.2a y b).

9.- Una vez congeladas las muestras, se conectan en las válvulas del liofilizador hasta su secado (6-7 h) (Fig. 5.3).

10.- Al concluir la desecación, se coloca un tapón de goma estéril a cada vial y se sella con un arillo de aluminio (Fig. 5.4). Para cada hongo procesado, se generan copias y se almacenan a 4°C como parte del esquema trabajo. Un sistema similar es utilizado para el método de crioconservación en nitrógeno líquido.

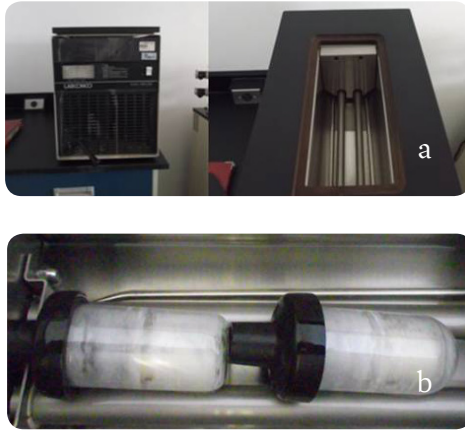


Figura 5.2 Ultracongelador de rodillos vista frontal y superior (a), Las botellas serológicas conteniendo el material biológico son colocadas en la cámara del ultracongelador, que contiene etanol y alcanza una temperatura de -50°C (b).

11.- Después de siete días de almacenamiento, se verifica la ausencia de contaminación y la conservación de las características propias del HE: viabilidad, aspectos morfológicos durante el crecimiento y esporulación homogénea. Si hay cambios sustanciales en el aspecto de crecimiento, en relación al aislado original, se examina estrategias para revertir el hongo degenerado y lograr conservar en un estado aceptable.



Figura 5.3 Equipo principal de liofilización.



Figura 5.4 Muestras liofilizadas de hongos entomopatógenos para su conservación a 4°C .



Recuperación de cultivos

- 1.- En condiciones de esterilidad, desinfectar el tapón de goma con un algodón impregnado con etanol al 70% o una solución de hipoclorito de sodio (dilución 1:1 del producto comercial).
- 2.- Añadir, con una jeringa a través del tapón de goma, un mL de agua estéril para reconstituir el cultivo. En caso de que el material liofilizado no se humecte adecuadamente, añadir otro volumen de agua hasta alcanzar la hidratación adecuada (Figs. 5.5 y 5.6).
- 3.- Agitar suavemente para mezclar bien la suspensión.
- 4.- Dejar reposar el material dentro de una campana de flujo laminar (15 a 30 min), permitiendo la rehidratación de los conidios.
- 5.- Una vez que los conidios se han rehidratado, tomar una alícuota de 100 μ L de la mezcla con una jeringa o micropipeta estéril y sembrar la suspensión en medio líquido o superficial. Si es en éste último, sembrar en cajas con medio de cultivo y distribuir con una varilla doblada e incubar a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 6.- Para evitar una posible presencia de contaminación, se debe verificar la viabilidad del cultivo y realizar las observaciones pertinentes (Figs. 5.7 y 5.8).



Figura 5.5 Cultivos liofilizados de hongos entomopatógenos.

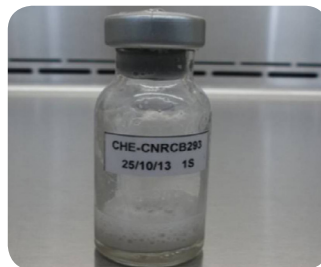


Figura 5.6 Restitución del cultivo liofilizado con agua destilada estéril.



Figura 5.7 Cultivo de *Beauveria bassiana* recuperado después de seis meses de conservación por liofilización.



Figura 5.8 Cultivo de *Isaria fumosorosea* recuperado después de seis meses de conservación por liofilización.

Cuadro 5.1 Ventajas y desventajas de la conservación por liofilización.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<p>Método ampliamente utilizado para la mayoría de los hongos esporulantes, ya que estos permanecen viables y estables por tiempos prolongados</p> <p>El microorganismo permanece en un contenedor sellado, por lo que se reduce el riesgo de contaminación</p> <p>Los cultivos liofilizados tienen menos restricciones para el envío por paquetería exprés</p> <p>Se puede almacenar a temperatura ambiente o a 4°C</p>	<p>La inversión inicial en equipos, es elevada</p> <p>No es recomendable para hongos con escasa esporulación o que no soporten el proceso de liofilización</p>

Literatura citada

Berlanga-Padilla, A., & V.M. Hernández-Velázquez. 2003. Conservación de hongos entomopatógenos en gel de sílice. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-23. 4 p Tecomán, Colima, Mexico.



- Butt, T.M., Wang, C., F.A. Shah & R. Hall. 2006. Degeneration of entomogenous fungi. p. 213-226. In: J. Eilenberg & H.M.T. Hokkanen (eds). Progress in biological control. Vol. 2. An ecological and societal approach to biological control. Amsterdam: Springer Netherlands. 322 p.
- Feng, M.G., T.J. Poprawski & G.G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. Biocontrol Science and Technology 4(1):3-34
- Humber, R.A. 2012. Preservation of entomopathogenic fungal cultures, p. 317-328. In: Lacey L.A. (ed). Manual of techniques in insect pathology. 2a Edition. Academic Press. 484 p. Yakim, Washington, USA.
- Mier, T., Toriello, C., M.A. Ayala-Zermeño & H. Navarro-Barranco. 2005. Conservación de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas. CUADERNO 51. CBS UAM-Xochimilco. 39 p. Distrito Federal, México.
- Simione, F.P. 2009. Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide. Thermo Fisher Scientific Inc. 12p. Wyman, USA
- Smith, D., & A.H.S. Onions. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. 2a. Edition. International Mycological Institute. CAB International, UK. 122 p. Wallingford, Oxon, UK.
- Veses, V., A. Richards & N.A.R Gow. 2008. Vacuoles and fungal biology. Current Opinion in Microbiology 11: 503-510.



6. CRIOCONSERVACIÓN a -70°C Y -196°C

Introducción

Los métodos de conservación pueden clasificarse en, aquellos que permiten la recuperación de especímenes a mediano plazo, y aquellos en los que es posible almacenar las muestras durante períodos de tiempo prolongados. Los HE de diferentes géneros, frecuentemente requieren métodos especiales de conservación para asegurar su óptima viabilidad, pureza e integridad genética (López-Lastra *et al.* 2002). Según los lineamientos enumerados por la WFCC (2010), y como medida de seguridad, los microorganismos se deben preservar en al menos dos métodos de conservación. La liofilización y la criopreservación, son los métodos recomendados para minimizar el riesgo de cambio genético. Para aquellas cepas que no toleran la criopreservación, se recomienda utilizar, ya sea la liofilización, o métodos alternos como aceite mineral o agua destilada estéril.

La criopreservación es el proceso de estabilizar material biológico a temperaturas criogénicas, en un rango de -20°C a -196°C . El uso de nitrógeno líquido permite alcanzar la temperatura más baja posible. A la temperatura de equilibrio, la difusión molecular es extremadamente lenta y la probabilidad de que ocurran reacciones químicas es prácticamente nula (Smith *et al.* 2001).

El proceso de congelación involucra un fenómeno complejo ya que después de décadas de investigación, aún no está completamente entendido. Estudios criobiológicos han permitido especular sobre lo que ocurre durante la congelación de células vivas y cómo estas se sobreponen a fenómenos adversos. El agua es el principal componente de las células vivas y debe estar disponible para los procesos químicos; cuando el agua en el sistema es transformado a hielo, el metabolismo celular se detiene. El hielo se forma a diferentes velocidades durante el proceso de congelación. Una congelación lenta permite la congelación externa antes de la formación de hielo intracelular (Simione 2009).



Durante el proceso de congelación, ocurre un desbalance osmótico propiciado por la migración de agua intracelular hacia el ambiente exterior. La velocidad de congelación tiene un efecto drástico sobre este fenómeno (Fig. 6.1).

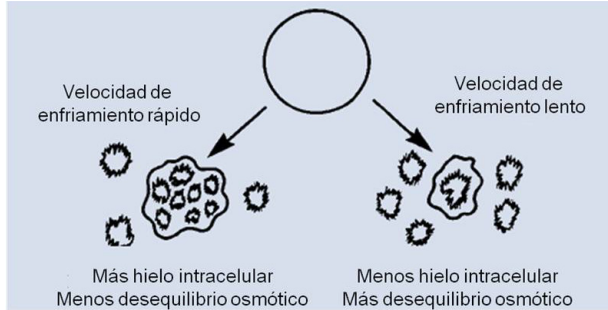


Figura 6.1 Para minimizar el daño celular debido al desbalance osmótico y la formación de cristales de hielo es crítico adicionar un agente crioprotector y considerar una velocidad de enfriamiento de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Smione 2009).

Es crucial conducir lentamente el proceso de congelación, ya que permitirá una gran pérdida de agua intracelular y, como consecuencia, habrá una menor formación de hielo intracelular. La permeabilidad de la célula también afecta la velocidad de pérdida de agua ya que, las células más permeables, toleran velocidades de enfriamiento más rápidas que las células menos permeables. Con pocas excepciones se recomienda una velocidad de 1°C por minuto (Fig. 6.1) (Simione 2009). El contenedor Mr. Frosty® (Thermo Scientific Nalgene), provee un sistema de diseño simple para alcanzar esta velocidad de enfriamiento (Figs. 6.2a y b)

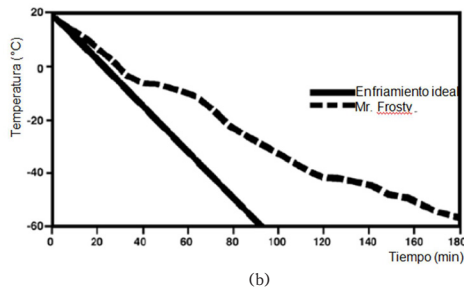



Figura 6.2 Mr. Frosty® de Nalgene (a) y la velocidad ideal de congelación alcanzada (b).



Para minimizar el efecto perjudicial del aumento en la concentración de solutos, así como de la formación de cristales de hielo, se requiere el uso de agentes crioprotectores o químicos, que protejan las células durante la congelación. El glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO), son los agentes crioprotectores más utilizados, aunque muchos otros aditivos se utilizan para propósitos específicos (Simione 2009).

Durante la puesta en marcha del método, y a causa de la complejidad de este proceso de conservación, pequeñas variantes pueden producir cambios drásticos en el material biológico. La estandarización de la metodología, asegura que los resultados de investigación sean consistentes y comparables. Por lo tanto, una vez que un régimen de criopreservación es establecido, se debe registrar detalladamente la metodología (Simione 2009).

Método

- 1.- Propagar el hongo entomopatógeno en cajas con medio de cultivo. Incubar a 27°C hasta alcanzar la esporulación.
- 2.- Previo al proceso de criopreservación, preparar crioviales, capaces de resistir temperaturas de -20°C o -70°C, así como criotubos NUNC® para almacenar en nitrógeno líquido. En cualquiera de los casos, agregar 1.3 mL de glicerol al 10% (v/v).
- 3.- Esterilizar en condiciones estandar (120°C, 15 lbs de presión por 15 min), el siguiente material: crioviales, criotubos, agujas de disección, micromanipuladores y popotes.
- 4.- Con un popote estéril, y en condiciones de asepsia, realizar cortes al cultivo esporulado. Enseguida, se colocan con una aguja de disección de tres a cuatro bloques por vial (Fig. 6.3a).
- 5.- Asegurarse de sumergir completamente los bloques en el crioprotector con la misma aguja de disección.



6.- Para conservar a -196°C , es recomendable sellar los criotubos NUNC® con tubos CrioFlex® (Figs. 6.3b y c).

7.- Se debe dejar reposar el cultivo por al menos 12 h a 4°C , para permitir la difusión del crioprotector al interior de las células. Este proceso es denominado curado o equilibrado (Humber 2012).

8.- A continuación, se inicia el proceso de congelación de manera gradual, partiendo de la temperatura de refrigeración, -20°C por 12 h y, finalmente a -70°C para ultracongelación. Para la conservación en nitrógeno líquido, después de permanecer por 12 h a -70°C , las cánulas criogénicas se sumergen directamente en el nitrógeno líquido. Para esto, el personal debe utilizar prendas de protección, guantes, mascarilla y mandil (Fig. 6.3d).

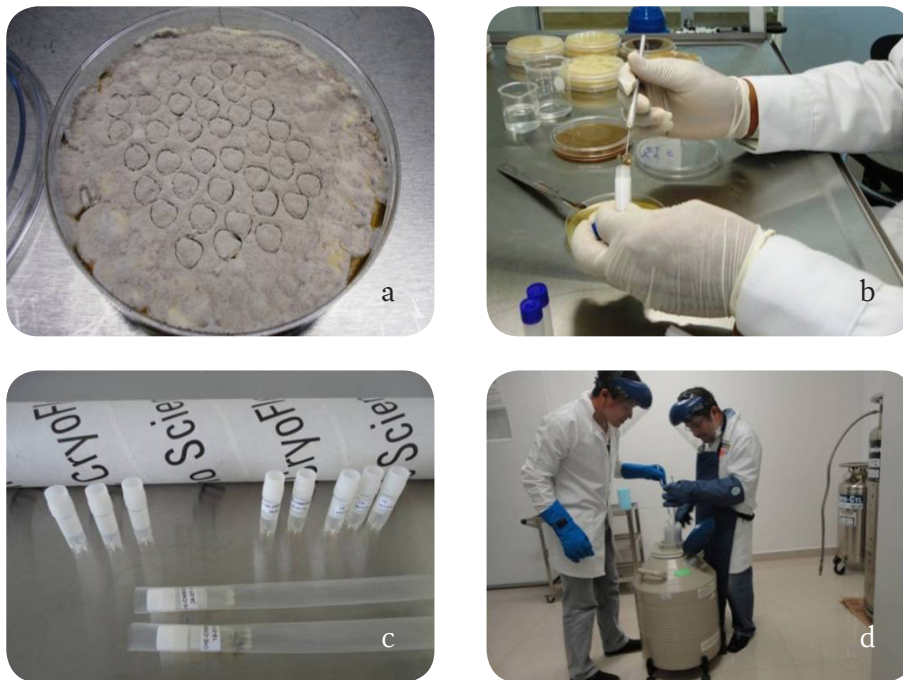


Figura 6.3 Proceso de criopreservación: (a) obtención de bloques circulares del cultivo; (b) transferencia a criotubos con glicerol al 10%; (c) sellado de viales con tubos CrioFlex para almacenar en nitrógeno líquido e (d) inmersión.

Debido a las ventajas que ofrece la criopreservación en nitrógeno líquido, en la CHE del CNRCB, se utiliza un esquema de lote semilla como estrategia para mantener la estabilidad genética de los microorganismos (Simione 2009). Esto, además, asegura disponer del cultivo original (poliespórico) en el futuro. Las réplicas del cultivo original, una vez procesados por este método, se almacenan en contenedores separados. En el primero, se conserva el lote semilla; mientras que en el segundo, se preserva el cultivo núcleo.

Recuperación de cultivos

Descongelar instantáneamente el criovial (exponerlo a un baño de agua a 37°C). Colocar los bloques de agar esporulados del hongo en medio de cultivo fresco, de manera opcional se puede esparcir 100 µL de esta suspensión. De manera alternativa, la descongelación de los crioviales se puede realizar de forma gradual (Fig. 6.4).

Se deben descartar posibles casos de contaminación, al monitorear las características del hongo (viabilidad y esporulación). En caso de detectar pérdida de patogenicidad, se recomienda realizar bioensayos con *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) o *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae).

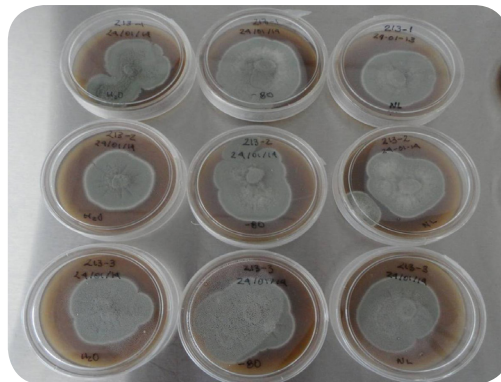


Figura 6.4 Diferentes aislados de *Metarhizium* recuperados después de criopreservación en nitrógeno líquido.



Materiales

- Conidios de HE producidos en cajas
- Criotubos NUNC® de 1.8 mL, para almacenar en nitrógeno líquido
- Solución de glicerol al 10%
- Mechero con alcohol
- Popotes desechables
- Bisturí con navaja
- Agujas de disección o micromanipulador
- Criomarcadores o crioetiquetas
- Cañas criogénicas
- Tubos CrioFlex®
- Nitrógeno líquido

Equipos y materiales de protección

- Tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido de baja presión, para alimentación
- Contenedor de nitrógeno líquido con sistema de canastillas
- Equipo de protección para la manipulación de nitrógeno líquido: mandil, mascarilla y guantes criogénicos
- Sensor de oxígeno atmosférico

Cuadro 5.1 Ventajas y desventajas de la crioconservación.

TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Ultracongeladores -70 °C	<p>Equipo convencional, disponible en algunos laboratorios</p> <p>Almacenamiento a largo plazo sin el uso de nitrógeno líquido</p> <p>Adecuado para la mayoría de hongos</p>	<p>Se pueden formar cristales de hielo, aun con un sistema de disminución gradual de temperatura</p> <p>Sujetos a pérdida por fallas de energía</p> <p>Como medida de seguridad almacenar el material biológico en nitrógeno líquido</p>
Fase vapor (-120 a -196°C)	<p>El suministro de nitrógeno líquido no contamina el contenido del vial</p> <p>No hay riesgo de que los viales exploten cuando se descongelan</p>	<p>La estabilidad de la temperatura depende del diseño del Dewar y del sistema de almacenamiento</p> <p>Se debe supervisar continuamente para mantener el nivel adecuado del nitrógeno líquido</p> <p>Se puede automatizar el control del nivel de nitrógeno líquido, siempre y cuando no haya interrupción de la energía eléctrica</p>
Inmersión en nitrógeno líquido (-190°C)	<p>Es estable la temperatura mientras está inmerso en nitrógeno líquido</p> <p>Es poco probable la formación de cristales durante el almacenamiento</p> <p>El monitoreo del nivel de nitrógeno se reduce al mínimo</p> <p>No se ve afectado por los cortes de energía</p>	<p>No hay garantías contra la infiltración de nitrógeno líquido en crioviales</p> <p>El contenido de los crioviales se puede contaminar por infiltración de nitrógeno líquido</p> <p>Los viales con infiltración de nitrógeno pueden explotar al momento de descongelar</p>



Literatura citada

- Humber, R.A. 2012. Preservation of entomopathogenic fungal cultures, p. 317-328. In: Lacey L.A. (ed). Manual of techniques in insect pathology. 2a Edition. Academic Press. 484 p. Yakim, Washington, USA.
- López-Lastra, C.C., A.E. Hajek & R.A. Humber. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Canadian Journal of Botany 80: 1126-1130.
- Simione, F.P. 2009. Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide. Thermo Fisher Scientific Inc. 12p. Wyman, USA.
- Smith, D., M.J. Ryan & J.G. Day. 2001. The UK national culture collection (UKNCC) biological resource: properties, maintenance and management. Pineapple Planet. 382p. Surrey UK.
- World Federation for Culture Collection (WFCC). 2010. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd Edition. 19p. Brussels, Belgium.

7. MEDIOS DE CULTIVO RECOMENDADO PARA HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Previo a este proceso, los medios de cultivo deben homogeneizarse, para poder verterse en los tubos de cultivo, los cuales pueden ser tapados con algodón o tapón de rosca (de bakelita), procurando no sellarlos para permitir la transferencia de vapor al interior del tubo. En el caso de cajas de Petri no es necesario homogeneizar.

Sabouraud Maltosa Agar con extracto de Levadura (SMAY)

	SMAY	SMAY/4
Maltosa	40g	10g
Polipeptona	10g	2.5g
Extracto de levadura	10g	2.5g
Agar	15g	15g
Agua destilada	1000mL	1000mL

Sabouraud Dextrosa Agar, extracto de levadura y cutícula de chapulín (SPHEQUIT®) (SDAYS)

Medio SDAYS	g/L
SDA	10
Polipeptona	1
Extracto de levadura	1
Cutícula chapulín (SPHEQUIT®)	1
Agar	15
Agua destilada	1000mL




Sabouraud Dextrosa Agar con extracto de levadura (SDAY)

	SDAY (g/L)	SDAY/4 (g/L)
Dextrosa	40	10
Polipeptona	10	2.5
Extracto de levadura	10	2.5
Agar	15	15
Agua destilada	1000mL	1000mL

Medio de cultivo con jugo V8

Medio V8	(1L)
Jugo V8	200mL
Extracto de levadura	10g
Agua destilada	800mL
Agar	15g



Medio de cultivo para *Hirsutella* spp.

Medio para <i>Hirsutella</i> spp.	g/L
Glucosa	10
Peptona de carne	5
Peptona de caseína	5
Extracto de levadura	5
Extracto de malta	3
Agar	15
Agua destilada	1000mL

Medio de cultivo H

Medio H	g/L
Sacarosa	10
Glucosa	5
Peptona de gelatina	0.5
Extracto de gelatina	5
Agar	18
Agua destilada	1000mL



Para más información sobre otros medios de cultivo utilizados para la propagación de HE, se invita a consultar el apéndice de la siguiente literatura.

Inglis, G.D., J. Enkerli & M.S. Goettel. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales, p. 189-253. In: Lacey L.A. (ed). Manual of techniques in insect pathology. 2a Edition. Academic Press. 484 p. Yakim, Washington, USA.

Smith, D., & A.H.S. Onions. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. 2a. Edition. International Mycological Institute. CAB International, UK. 122 p. Wallingford, Oxon, UK.

http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/19070510/media_recipes.pdf

Sugerencia de como citar este documento:

Montesinos-Matías R., M.A. Ayala-Zermeño, A.M. Berlanga-Padilla. 2015. Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA. SENASICA. Tecomán, Colima, México. Pp. 59. ISBN: 978-968-5384-08-7

www.sagarpa.gob.mx

www.senasica.gob.mx

 SENASICA SAGARPA  @SENASICA  SENASICA SAGARPA

"Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.

Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa".

Quejas • Denuncias

Órgano Interno de Control en el SENASICA

+52(55) 5905 1000, ext: 51648

+52(55) 3871 8300, ext: 20385

Dudas sobre:

• Campañas Fito o Zoonitarias

• Movilización de Productos

Agroalimentarios y Mascotas

01 800 987 9879