

12. Aislamiento, conservación y reactivación de cepas fúngicas de la Colección del Centro de Investigación en Micología Aplicada (CIMA) de la Universidad Veracruzana



ELMIRA SAN MARTÍN ROMERO*

DOI: <https://doi.org/10.52501/cc.425.12>

Resumen

Las colecciones biológicas como los ceparios promueven la conservación *ex situ*, son de suma relevancia en materia del conocimiento de la biodiversidad, en particular de especies de interés biológico, cultural, biotecnológico, económico e incluso de salud pública. Además, las colecciones fúngicas son fuentes de recursos genéticos cuyo propósito es la preservación de la diversidad biológica. El objetivo de este trabajo fue aislar, conservar y preservar las cepas fúngicas de la colección del Centro de Investigación en Micología Aplicada (CIMA) para su uso a corto y largo plazo. Así también verificar la viabilidad y reactivar las cepas de la colección que comprenden ejemplares donados por el Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa (LATEX) conservados desde el 2016, con el fin de conocer y mantener la conservación adecuada de ejemplares útiles y sus características propias para futuras investigaciones, actividades de enseñanza y transferencia de conocimiento. Se realizaron métodos de conservación a corto y largo plazo, la siembra, reactivación y aislamiento de ejemplares fue a partir de las colectas de carpóforos, hongos endófitos, fitopatógenos y entomopatógenos. De los 102 ejemplares donados se consideró para su reactivación sólo 68 debido a la antigüedad

* Doctora en Ciencias en Ecología y Biotecnología. Académica del Centro de Investigación en Micología Aplicada de la Universidad Veracruzana, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7774-7845>; correo electrónico: elsanmartin@uv.mx

y estado de estos. Por otro lado, de los especímenes aislados y colectados por el CIMA se trabajó con 54 que fueron colectados y purificados durante el periodo de agosto del 2021 hasta abril del 2022. Se lograron reactivar aproximadamente 49 cepas de las 68 donadas, de las 54 cepas pertenecientes al CIMA se logró aislar y conservar el 100 %

Palabras clave: *hongos, colección, conservación, diversidad.*

Introducción

El estudio y la conservación de hongos desempeñan un papel crucial en la investigación científica. Los ceparios no son una entidad estática que sólo sirve para resguardar; al contrario, son la referencia de la biodiversidad que posee un área, ecosistema u hospedero definido y la base científica que permite el desarrollo de innumerables investigaciones (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2015).

Los ceparios o colecciones de microorganismos son de gran importancia para la investigación biológica y, por lo tanto, para el avance de los muchos ámbitos relacionados, ya sea para la medicina, agricultura, industria alimentaria, forestal, biotecnológica, química, entre otras; dependiendo del área de investigación son las características de dicha colección (García López, 2013; Quintero-Rodríguez *et al.*, 2023).

Las colecciones de cepas se conservan en un laboratorio a partir de distintos métodos de conservación, dependiendo de los ejemplares y el tiempo estimado de almacenaje, todo lo necesario para mantener sus características (Acosta Ovallos, 2019). Según Fernández Andreu y colaboradores (2005, 2013), El proceso de aislamiento y conservación de estos ejemplares involucra métodos precisos y específicos, variando según el tipo de hongo, existen tres categorías en las que podemos agrupar los métodos de conservación según el tiempo en que las muestras conservadas mantienen su viabilidad: corto, mediano y largo plazo.

La conservación de las muestras es no sólo importante por lo ya mencionado, sino también por ser un valioso material de importancia en actividades de enseñanza y transferencia de conocimiento. Resumir, organizar, calificar y diseminar la información taxonómica y biogeográfica, además de promover

la conservación *ex situ*, es de suma relevancia en materia del conocimiento de la biodiversidad, en particular de especies de interés biológico, cultural, biotecnológico, económico e incluso de salud pública (Estrada y Vélez, 2003; Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2015).

Los ceparios o colecciones de microorganismos como los hongos son fuentes de recursos genéticos cuyo propósito es la preservación de la diversidad biológica, pero también de microorganismos aislados, caracterizados e identificados a partir de muestras ya sea de diferentes ecosistemas o con algún tipo de importancia como ecológica, fitopatógica, entre otros y obtenidas de investigaciones realizadas en diferentes periodos de tiempo (Montesinos *et al.*, 2015). La preservación de los hongos debe garantizar su viabilidad en estado inactivo, puro y homogéneo, bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica y fisiológica, garantizando su disponibilidad para actividades que se requieran (Gutiérrez *et al.*, 2017).

Tales acervos, además de servir como repositorios de material biológico para la investigación científica, son un valioso material de importancia en actividades de enseñanza y transferencia de conocimiento, además de ser repositorios genéticos se utilizan en la redefinición de la clasificación biológica esto mediante la extracción de ADN de cepas preservadas incluso muy antiguas. Por tal motivo el mantener, reactivar y conservar los aislamientos fúngicos del cepario del Centro de Investigación en Micología Aplicada, representa una oportunidad para el quehacer docente, de divulgación e investigación de los académicos que se interesen en el uso de dicha colección (Mata y Salmones, 2011).

En este trabajo nos enfocamos en el cepario del Centro de Investigación en Micología Aplicada (CIMA). Dicha dependencia forma parte de los Centros e Institutos de la Universidad Veracruzana desde el año 2019, y tiene como propósito realizar investigación básica y aplicada en biología, ecología, química de hongos y biotecnología, así como impulsar la divulgación científica.

Dentro de sus actividades para contribuir a lo antes mencionado es necesaria la disponibilidad de colecciones biológicas, entre estas, de cepas fúngicas para el desarrollo de las diferentes investigaciones o estudios.

Este trabajo se llevó a cabo con el fin de aislar, conservar y/o preservar las cepas fúngicas de la colección del CIMA para su uso a corto y largo plazo en las diferentes actividades de docencia e investigación. Así también para

verificar la viabilidad y reactivar las cepas fúngicas de la colección del CIMA que comprenden ejemplares donados por el Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa (LATEX) conservados desde el 2016.

Todo lo mencionado con anterioridad coadyuva a conocer no solo los especímenes colectados aislados y conservados si no a resguardar un valioso acervo biológico y genético de los diferentes ecosistemas y relaciones ecológicas que guardan en el habitan de donde fueron colectados, además de representar una valiosa oportunidad de conservar, investigar y divulgar dichos conocimientos.

Materiales y métodos

Para la preservación y reactivación de cepas se utilizaron métodos que se consideran métodos a mediano plazo (entre 2 y 5 años de viabilidad de los cultivos) y accesibles económicamente Una vez aisladas, purificadas y reactivadas las cepas fueron identificadas de manera tentativa por sus características morfológicas y etiquetados con una clave interna conformada por el prefijo CIMA seguido de una letra mayúscula correspondiente al tipo de hongo y 3 dígitos consecutivos, ejemplo: CIMA-F-000. Finalmente, las cepas reactivadas y aisladas se conservaron en refrigeración a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Siembra y /o aislamiento de ejemplares

La siembra y aislamiento de ejemplares se realizó a partir de las colectas de carpóforos, así como hongos endófitos, fitopatógenos y en algunos casos parásitos de insectos (entomopatógenos) realizadas por los estudiantes e investigadores del CIMA. Según el tipo de ejemplar se utilizaron diferentes métodos para su aislamiento. Los carpóforos y hongos entomopatógenos inicialmente se aislaron en cámara húmeda, y por siembra directa en medio Agar Papa Dextrosa estéril adicionado con 0.1 % de antibiótico.

En el caso de los hongos endófitos, se utilizó el método reportado por Medel *et al.* (2021), el cual consiste en realizar cortes de aproximadamente 0.5 cm del tejido vegetal de donde se desea aislar los hongos. Se colocaron

los cortes de tejido vegetal en un vaso de precipitado pequeño y se realizó un lavado con alcohol al 96 % por 1 minuto seguido por un lavado de hipoclorito de sodio al 3 % de 10 minutos, luego se escurrió la solución y se mantuvieron en alcohol al 70 % por 30 segundos, por último, se enjuagaron con agua estéril.

Para los hongos fitopatógenos, a partir del tejido vegetal enfermo, se realizaron cortes del tejido en las áreas donde iniciaba el síntoma y se realizaron 3 lavados con hipoclorito de sodio al 3% seguido de un lavado con agua estéril. Posterior al tratamiento de lavado y desinfección del material vegetal se realiza la siembra de 4 fragmentos por caja de Petri con medio PDA (Agar Papa Dextrosa adicionado con 0.1 % de antibiótico) en todos los casos se colocaron en la incubadora entre 24 a 27 °C por un periodo de 7 a 10 días para observar el crecimiento de los hongos (Mata y Salmones, 2021) Una vez se observa crecimiento fúngico, se resiembra cada aislamiento en cajas Petri con medio PDA a fin de tener cepas puras.

Viabilidad y reactivación de cepas

Se verificó la viabilidad de la colección de 102 cepas donadas por LATEX (Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa) la cual comprende ejemplares aislados y conservados desde el 2016. Dado que por motivo de la pandemia de Covid-19 no se realizaron resiembras constantes, se requería recuperar lo más pronto muestras de dichos ejemplares.

Para reactivar y verificar la viabilidad de las cepas fúngicas, el primer paso fue tomar los tubos con las cepas a reavivar y se le decantó aceite mineral y agua estéril, posteriormente con ayuda de una asa bacteriológica se raspó el micelio y se resembró en cajas con PDA y en tubos de ensayo con caldo nutritivo, finalmente se incubó a una temperatura entre 24 a 27 °C durante un periodo de 7 a 20 días o hasta observar crecimiento, en algunos casos fue necesario estresar los ejemplares con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad para acelerar el proceso, una vez detectado el desarrollo del hongo se realizaron laminillas fijas para observar su morfología y/o estructura, y se cercioró que se tratase del ejemplar correspondiente a la colección, una vez realizado lo anterior se resembraron nuevamente en cajas Petri con medio PDA y antibiótico al 0.1%.

Conservación de cepas fúngicas a corto plazo: resiembras continuas

Este método, mayormente conocido como método tradicional, consiste en transferir de un medio de cultivo en donde el hongo está a punto de agotar los nutrientes a otro medio nuevo que permitirá al micelio continuar su crecimiento.

Para realizar la resiembra de las cepas se cortó pequeños fragmentos de micelio, de la parte apical del mismo, con la ayuda de una navaja estéril o de un sacabocados de cobre esterilizado, como lo mencionan por Mata y Salmones, 2021. La temperatura adecuada de crecimiento del micelio depende de la especie de hongo, pero en general, durante este periodo de incubación la temperatura utilizada es de 25 °C. Antes de que el micelio cubra completamente el medio de cultivo en la caja de Petri, ésta se coloca dentro de una bolsa de plástico pequeña, con todos los datos necesarios (número de cepa, medio de cultivo utilizado, fecha de resiembra, etc.) y se almacena a 5° C.

Conservación de cepas fúngicas largo plazo: conservación en agua estéril y aceite mineral (método de limitación de oxígeno)

Se utilizó los métodos reportados por Castellani 1963, 1967 y Panizo 2005 los cuales consisten en la adición de agua estéril y aceite mineral en tubos de ensayo o viales que contienen medio de cultivo y en los que se ha desarrollado el micelio de la cepa a conservar.

Para este método se colocó medio de cultivo PDA en tubos de ensayo o viales, vertiendo sólo el 40 % del volumen. Se esterilizaron los tubos con el medio de cultivo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, posteriormente se colocaron los tubos de manera inclinada para permitir la adecuada solidificación de éste. Se inoculó el hongo dentro del tubo de ensayo e incubó entre 25 a 27 °C por aproximadamente 10 días. Antes de que el micelio cubriera completamente el medio de cultivo, se adicionó agua y 1 ml de aceite mineral (densidad 0.8) previamente esterilizados, hasta cubrir completamente el micelio dentro del tubo de ensayo. Los tubos generalmente se resguardan de esta manera por un año en refrigeración a 5 °C.

Resultados y discusión

Se lograron reactivar 59 cepas de las 68 donadas de la colección de LATEX. C.S, de las 54 cepas pertenecientes al laboratorio del Centro de Investigación en Micología Aplicada (CIMA) se logró aislar y conservar el 100%. Finalmente, las 113 cepas se encuentran en conservación tanto a corto como largo plazo, permaneciendo en refrigeración a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los principales géneros y/o especies fueron los siguientes:

Tabla 12.1. *Cepas y especímenes más representativos aislados, reactivados y conservados.*

<i>Clave</i>	<i>Género y/o especie</i>	<i>Hospedero/sustrato</i>
CIMA- F-009	Curvularia sp.	mango
CIMA- F-040	Fusarium sp.	Papa
CIMA- F-046	Fusarium monilliforme	Limonaria
CIMA- F-048	Colletotrichum spp.	Limón
CIMA- F-050	Curvularia sp.	Cacao
CIMA- F-071	Fusarium oxysporum	Vainilla
CIMA- F-085	Geotrichum candidum	Espárrago
CIMA- F-088	Fusarium graminearum	Espárrago
CIMA- F-093	Fusarium oxysporum	Fresa
CIMA- F-121	Fusarium solani	Café
CIMA- F-122	Chaetocapnodium zapotae	Plantas y materiales en descomposición
CIMA- F-131	Monascus sp.	Maracuyá
CIMA- A-134	Cordyceps sp. 1	Avispa
CIMA- A-138	Cordyceps sp.	Pupa 2
CIMA- F-203	Curvularia lunata	papa
CIMA- F-098	Fusarium spp.	Caña de azúcar
CIMA- A-143	Xylaria spp.	Orégano
CIMA- B- 154	Agaricus spp.	Materia orgánica
CIMA- F-043	Tridaviosis spp.	Ciclamen

Fuente: Andrade y San Martín (2022).

Figura 12.1. *Hospederos de donde fueron aisladas algunas cepas a) Pupa de insecto, b) rama de bosque mesófilo de montaña (BMM).*



Figura 12.2. *Cepas aisladas de distintos hospederos y sustratos en caja Petri.*



Figura 12.3. *Cepas aisladas de distintos hospederos y sustratos en caja Petri.*



Fuente: de figuras 12.1, 12.2 y 12.3 son de elaboración propia

De acuerdo con las diversas técnicas de conservación y aislamiento de cepas utilizadas en este estudio se encontró en trabajos previos que han abordado métodos similares, reportes de un 100% de viabilidad en sus cepas según Panizo *et al.* (2005), no obstante, es importante señalar que las cepas utilizadas en dicho estudio no presentaban una antigüedad comparable con las que se manejan en los ejemplares donados al CIMA, lo que podría influir en la viabilidad observada. El proceso de envejecimiento de las cepas podría alterar sus características fisiológicas, afectando su capacidad de recuperación tras el proceso de conservación. Este factor podría ser un elemento importante al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los de Panizo *et al.* (2005).

Por otro lado, Toscano *et al.* (2015) utilizaron diferentes métodos de preservación, como liofilización, agua estéril y soportes de papel y suelo. Los resultados obtenidos en este estudio variaron considerablemente, con una viabilidad del 74.3 % en liofilizado, 85.9 % en agua estéril, y 33.4% en soporte papel y suelo. Estos resultados muestran una mayor disparidad en los efectos de las técnicas de preservación, lo que sugiere que factores como las condiciones de almacenamiento, el tipo de cepa y la edad de esta pueden influir significativamente en la viabilidad post conservación. En comparación, el presente estudio encontró un 32 % de viabilidad, lo que es inferior a lo reportado por Toscano *et al.* (2015).

Es importante destacar que, a pesar de que la viabilidad observada en este estudio es más baja en comparación con otros trabajos previos, se alcanzó un 100 % en cuanto a aislamiento y conservación. Este hallazgo es significativo porque sugiere que, aunque algunas cepas no lograron mantener un alto porcentaje de viabilidad, las técnicas empleadas fueron efectivas para conservar y aislar las cepas sin contaminaciones. Este aspecto es crucial en el contexto de la investigación microbiológica, donde la pureza y estabilidad de las cepas son esenciales para futuras aplicaciones experimentales.

Tanto Fernández Andreu *et al.* (2005) como Godínez y Calderón (2008), coinciden que el método de preservación a elegir debe: garantizar la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y

minimice la ocurrencia de los eventos genéticos. Así también Weng Alemán *et al.* (2005) comentan que de igual manera debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable, por lo que nuestro estudio cumple en gran medida con estos criterios.

Una posible explicación para la baja viabilidad observada podría ser la antigüedad de las cepas utilizadas en este estudio. Las cepas donadas por el LATEX al CIMA son de un origen más antiguo, lo que podría haber afectado su capacidad para resistir los procesos de conservación, especialmente aquellos que requieren la preservación de estructuras celulares complejas o la reactivación de microorganismos después de períodos largos sin actividad metabólica. Además, el tipo de medio utilizado, la técnica de conservación específica y las condiciones de almacenamiento pueden haber influido en la viabilidad observada, como se evidenció en el trabajo de Pinzón-Gutiérrez *et al.* (2009).

En resumen, aunque la viabilidad observada en este estudio fue inferior a la de otros trabajos previos, los resultados son consistentes con las particularidades de las cepas envejecidas y las condiciones de conservación empleadas. La tasa de aislamiento y conservación del 100 % en las cepas que únicamente fueron colectadas en el periodo del estudio indica que, a pesar de la baja viabilidad, las técnicas de aislamiento y preservación fueron eficaces en cuanto a la conservación a largo plazo de las cepas, lo que podría ser un punto clave para futuras investigaciones y optimización de métodos de conservación.

Conclusión

Se lograron reactivar 59 cepas representando un porcentaje del 86 % de las 68 cepas seleccionadas de la colección del LATEX. Se aislaron 54 cepas, representando un 100 % de las cepas colectadas por el CIMA.

Se comprobó que los métodos de preservación de cepas fúngicas en agua bajo capa de aceite mineral se mantuvieron en el tiempo, demostrando su rentabilidad y su elevada capacidad de preservación de cepas de hongos y ambos métodos son sencillos, económicos, poco laboriosos y requieren escaso espacio para el almacenamiento de las cepas.

De igual forma se aporta un acervo para el conocimiento de recursos genéticos y preservación de la diversidad biológica, que se pueden encontrar en distintos sustratos, hospederos y ecosistemas.

Se continúa dando seguimiento al cerapio, manteniendo viables las cepas resguardadas para así lograr un acervo de mayor cantidad, el CIMA cuenta con una gran colección de cepas fúngicas que aumenta con el quehacer diario las cuales son utilizadas por estudiantes y docentes para temas de investigación, divulgación científica, actividades de enseñanza y transferencia de conocimiento.

Referencias

- Acosta Ovallos A. K. (2019). *Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander*. 98p. Universidad de Santander UDES Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Programa de Microbiología Industrial Bucaramanga, Colombia.
- Castellin A., Botero Rute, L. M. Ovalle Másmela, Criollo Campos, J. C. (1963). *Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water*. Mycopathologia et Mycologi Applicata, 20, 1-6.
- Castellani A. (1967). *Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 70, 181-4.
- Estrada, M. y Vélez, P. (2003). *Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica), 97-103.
- Fernández Andreu, C. M.; Martínez Machín, G.; Perurena Lancha, M. R.; Illnait Zaragoza, M. T. y Valdés Hernández, I. (2005). *La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri": funciones y retos*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 57(3).
- Fernández Andreu, C. M., Díaz Suárez, L. A., Illnait Zaragoza, Ma. T., Aragonés López, C., Martínez Machín, G., Perurena Lancha, M. R., y Rodríguez Gutiérrez, I. (2013). *Conservación de cultivos de hongos de importancia médica en agua destilada*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 65(3), 361-369.
- García López, T. (2013). *Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas* [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Godínez S. y Calderón, M. (2008). *Métodos Alternativos para la Preservación de hongos Filamentosos*. Ciencia y Tecnología de Alimentos, 18, 2. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia Carretera al Guatao, km 3 ½, C.P. 19 200, La Habana, Cuba.