

**DOCUMENTO BORRADOR DE REFERENCIA  
PROTOCOLO DE MANEJO DE COLECCIONES DE HONGOS**

Mayo, 2009

---

# CONTENIDO

<b>MACROHONGOS</b> .....	<b>4</b>
Recolección.....	4
Descripción .....	4
Preservación .....	9
Cultivo .....	10
Identificación .....	11
Bases de Datos .....	13
Envío de especímenes .....	14
<b>MICROHONGOS</b> .....	<b>15</b>
Recolección.....	15
Aislamiento.....	16
Medios de Cultivo .....	17
Identificación: .....	18
Preservación .....	18
Especímenes de Herbario.....	19
Mantenimiento de la colección .....	19
Cultivos vivos.....	20
Base de Datos .....	21
Envío de material .....	21
<b>LIQUENES</b> .....	<b>22</b>
Recolección.....	22
Preservación .....	24
Revisión .....	24
Identificación .....	25
Mantenimiento de la colección .....	26
Bases de Datos .....	27
Envío de material .....	27
<b>APENDICE I</b> .....	<b>28</b>

# PROTOCOLO PARA LA RECOLECTA, DESCRIPCION, IDENTIFICACION Y MANTENIMIENTO DE HONGOS

- *Elaborado por la Unidad Estratégica de Hongos, INBio*  
Milagro Mata H.  
Loengrin Umaña T.  
Jose Luis Chaves C.  
*Y la colaboración del Museo Nacional de Costa Rica*  
Armando Ruíz  
Agosto, 2006

En Costa Rica los hongos constituyen un reino casi desconocido, a pesar de la gran diversidad que posee este país y de la importancia que tienen por las funciones que desempeñan tanto en los bosques como en el entorno en general. En nuestro país se conocen aproximadamente 2,000 especies, pero se calcula que podrían encontrarse de 60 a 70,000 especies.

Tomando en cuenta la importancia que tienen los hongos, líquenes, microhongos, macrohongos principalmente dentro de los ecosistemas, y a los pocos estudios que se han realizado en nuestro país al respecto, resulta muy importante establecer las pautas a seguir, para dar inicio a su estudio y así lograr una adecuada calidad científica en las recolecciones, descripciones, preservación, identificación y cultivo de los especímenes; así como un adecuado manejo de las colecciones que se conservan en las diferentes instituciones del país.

Importante resaltar que existen muchas formas de recolectar, procesar y describir los especímenes, principalmente en el campo, esto dependiendo de los grupos de hongos con los que se está trabajando; a continuación se presenta una metodología general para macrohongos, microhongos y líquenes.

## MACROHONGOS

Se les llama macrohongos, al grupo constituido por cuerpos fructíferos que pueden ser observados a simple vista, entre ellos las "orejas de palo", "sombrellas", "estrellas de tierra", "hongos gelatinosos", "tipo coral", "lenguas de tierra", "costras sobre madera", etc.

### Recolección

Resulta indispensable llevar a cabo el siguiente procedimiento para que las colecciones tengan valor científico:

1. Tomar nota del sustrato, y cuando sea posible anotar datos sobre la vegetación que rodea el espécimen.
2. Tomar fotografías de los especímenes.
3. Utilizar una cuchilla o puñal para remover el hongo. Es necesario introducir la cuchilla unos cuantos centímetros hacia abajo de la base del hongo para no cortar el estípite y la volva, cuando este está presente.
4. Remover el hongo con una porción pequeña de sustrato en su base.
5. Recolectar especímenes tanto jóvenes como maduros, y en la mayor cantidad posible.
6. Colocar los especímenes removidos sobre papel aluminio ("nunca en bolsas plásticas"), de manera que se puedan cerrar los extremos sin producir daños a la muestras.
7. Colocar las recolecciones dentro de una canasta adecuada (nunca dentro de mochilas, bolsas plásticas o de papel), para su traslado al laboratorio o área de trabajo.



### Descripción

La descripción macroscópica de los hongos debe realizarse en el laboratorio o área de trabajo lo más pronto posible, ya que la mayoría de ellos pierden humedad en muy poco tiempo y por lo tanto se producen cambios de tamaño y color, aspectos muy importantes para efectos taxonómicos. Por tal motivo, es recomendable hacer las recolectas por la mañana y describir los especímenes por la tarde, siguiendo los siguientes pasos:

## 1. *Mapa esporico o esporada*

La esporada se hace colocando el pileo entero (cuando existen suficientes especímenes) o una porción de éste (cuando existe uno o dos especímenes únicamente) con el himenio (lamelas, poros, dientes, venaciones, etc.) hacia abajo sobre un papel blanco o de otro color dependiendo del color del himenio. El papel blanco con el pileo se protege con papel cera o con una caja de petri invertida y se deja reposar por algunas horas hasta que las esporas sean depositadas. Se anota el color de las esporas en masa cuando están frescas y luego cuando la esporada está seca. Si el cuerpo fructífero no es pileado, la esporada se lleva a cabo colocando la superficie fértil del espécimen en contacto sobre un papel blanco, se protege con papel cera y se deja reposar por algunos minutos u horas, hasta que las esporas sean depositadas.

## 2. *Descripción macroscópica*

La descripción de las características macroscópicas se lleva a cabo únicamente con los especímenes frescos o recién recolectados, también puede hacerse con los especímenes secos, e.g., los poros en los Polyporales. En las descripciones se menciona el color de estos cuando frescos y secos. . Es muy importante también tomar 2 o 3 fotografías de los especímenes antes de describirlos, esto si no se tomaron fotografías directamente en el campo.

Muchos de los cuerpos fructíferos de los hongos que se recolectan pueden ser divididos en tres partes (pileo, himenio y estípite); sin embargo alguna de esas partes podría no estar presente, o bien tratarse de un cuerpo fructífero totalmente diferente, esto dependiendo del grupo de hongos que se haya recolectado. En este caso, la descripción se hace anotando todas las características de las partes presentes, o bien describiendo cuidadosamente todas las características observables a simple vista y con lupa.



Generalmente, el orden para realizar una descripción macroscópica es la siguiente:

### 2.1. *Píleo*

Es la parte superior o sombrero de un ascocarpo o basidiocarpo.

#### 2.1.a. Tamaño:

Se mide el diámetro cuando es circular, o la longitud y ancho cuando no lo es, con una regla graduada en mm o cm. Es recomendable cortar el espécimen longitudinalmente para facilitar la medición. Cuando la colección está formada por más de dos especímenes, se establece un intervalo tomando en cuenta del más pequeño al más grande.

#### 2.1.b. Forma:

Se anota la forma del píleo tanto en cuerpos fructíferos jóvenes como maduros. Es recomendable tomar en cuenta todas las formas presentes y establecer ámbitos. Entre estas formas podemos encontrar: convexos, campanulados, cónicos, planos, parabólicos, cóncavos, elevados, infundibuliformes, depresados, mamilados, umbonados, umbilicados, etc.

#### 2.1.c. Color:

El color del píleo se anota tomando en cuenta especímenes jóvenes y maduros, ya que algunos pueden cambiar con la edad. Es muy importante anotar el color del disco o zona central del píleo, o cualquier otra observación de color en otra parte del píleo cuando ésta sea diferente, y además es importante anotar el color del margen. También es importante describir si existe algún cambio de color cuando el hongo es manipulado. Todos los colores descritos deben ir respaldados por un código standard de colores.

#### 2.1.d. Margen:

El margen del píleo de un hongo puede variar dependiendo del grado de expansión que éste haya alcanzado. Es recomendable cortar longitudinalmente el cuerpo fructífero para describir el tipo de margen, el cual puede ser: incurvado, decurvado, enrollado, plano, elevado, etc.

Si el píleo es observado desde arriba, es decir con una vista superior sin haber sido cortado, este puede ser: entero, erodado, rimoso, apendiculado, etc.

La textura del margen del píleo es otra característica que se debe anotar, la cual podría ser, entre otras, estriada, tuberculada-estriada, plicada-estriada, traslúcida-estriada, surcada, etc.

#### 2.1.e. Superficie:

La textura y ornamentación de la superficie a menudo varían con la edad, con las condiciones ambientales, etc., por ello es muy importante describir la superficie del píleo en todos los especímenes que integren una colección, la cual puede ser, fibrilosa, escamosa, escuarrosa, pruinosa, tomentosa, velutinosa, glabra o lisa, areolada, pubescente, entre otras.

#### 2.1.f. Contexto:

El contexto es el tejido carnoso interno y estéril que forma parte del píleo o del cuerpo fructífero en general, para lo cual se debe anotar consistencia y color.

## 2.2. *Himenio o Superficie fértil*

Es la superficie ya sea lisa, porosa, lamelada, dentada, verrucosa, reticulada, con venaciones, etc; que generalmente esta cubierta por estructuras reproductivas microscópicas tales como esporangios, ascos, basidios, conidios, los cistidios y las paráfisis son estériles cistidios, paráfisis, esporas, etc.

Cuando el himenio está constituido por lamelas, se debe anotar lo siguiente:

### 2.2.a. Tipo de unión:

Varía con la edad del espécimen, puede ser: libre, decurrente, subdecurrente, adnadas, anexas, sinuadas, emarginadas, etc.

### 2.2.b. Color:

Anotar el color y los cambios de color, si son observados, tanto en especímenes jóvenes como maduros.

### 2.2.c. Espaciamiento:

Se refiere al espacio entre una lamela y la siguiente, las cuales pueden ser: distantes, subdistantes, próximas, apiñadas, etc.

### 2.2.c. Grosor:

Anotar sí las lamelas son angostas, anchas, moderadamente angostas o anchas, etc. Es importante medir el ancho de las lamelas en cm o mm.

### 2.2.d. Margen:

Observar y anotar si el margen de la lamela es liso, con ranuras, dentado, erodado, serrado, serrulado o marginado (el margen tiene color diferente al resto de la lamela, en este caso se debe anotar el color).

### 2.2.e. Lamélulas:

Lamelas muy pequeñas que no alcanzan a unirse al estípite o al punto de unión al sustrato en los casos en que no hay estípite. En este caso se anota el número de series observadas.

Si el himenio esta constituido por poros, se debe tomar en cuenta lo siguiente: si es redondeado (con poros circulares), radialmente elongado (con poros alargados), daedaloide (con poros distribuidos en forma de laberinto), irregular (con poros redondos, radialmente elongados a daedaloides), angular (con poros cuyo contorno no es redondeado, sino en forma de angulo). También el número de poros por milímetro y el color.

## 2.3. *Estípite*

Es el pie que sostiene el píleo de un basidiocarpo, o de un ascocarpo, para lo cual se debe anotar:

2.3.a. Tamaño:

- a. Longitud (se mide en mm o cm de la base al ápice).
- b. Ancho (generalmente se mide hacia el ápice, es recomendable cortar el espécimen longitudinalmente).

2.3.b. Forma:

El estípite puede ser: igual o uniforme, bulboso, abruptamente bulboso, clavado, subclavado, con forma de tapón, radicado, etc.

2.3.c. Posición:

Se debe anotar si el estípite es: central, lateral o excéntrico.

2.3.d. Color:

Anotar color y cambios de color tanto en especímenes jóvenes como maduros.

2.3.e. Superficie:

Puede ser húmeda, seca, o viscosa. Las mismas características anotadas antes para la superficie del pileo se pueden utilizar para la superficie del estípite.

2.3.f. Contexto:

El tejido interno del estípite puede ser sólido, semi-relleno ó vacío

2.3.g. Otras características:

- a. Micelio en la base del estípite (Anotar color y abundancia).
- b. Prolongación del estípite en el sustrato.
- c. Presencia de rizomorfos (semejantes a pequeñas raíces que corren en el sustrato, se debe anotar el color y la abundancia).

2.4. **Anillo**

El anillo son remanentes de un velo parcial que cubre el hongo en estadíos tempranos del desarrollo. Cuando este está presente, se debe describir la posición, si es movable ó fijo y el color.

2.5. **Volva**

La volva son remanentes del velo universal que recubre todo el hongo en estadíos muy tempranos de desarrollo. Cuando se encuentre presente, se debe describir si tiene forma de saco, u otras formas descriptibles. Además si es membranosa, frágil, formando como parches o zonaciones en la base del estípite.

## 2.6. *Hábito de crecimiento*

Es la apariencia general externa y característica, o manera de crecer de un hongo. Anotar si crece en forma solitaria, esparcido, agrupado ó formando racimos.

## 2.7. *Sustrato*

2.8.a. Terrestre: sobre suelo.

2.8.b. Coprófilo: sobre estiércol.

2.8.c. Lignícola: sobre madera

2.8.d. Fungícola: sobre otros hongos.

También pueden encontrarse hongos creciendo de forma parasítica sobre otros seres vivos.

## 2.8. *Pruebas Macroquímicas*

Observar y anotar de acuerdo con los diferentes grupos de hongos, el color o cambios de color al agregar reactivos químicos en la superficie del píleo, contexto, superficie fértil, superficie y contexto del estípite, o bien en la superficie o contexto de hongos con otras formas de cuerpo fructífero. Observar y chequear aproximadamente entre 15 y 20 minutos. Los reactivos a utilizar pueden ser uno o varios de los siguientes:

Sulfato ferroso acuoso al 10%

Hidróxido de Sodio acuoso al 10%

Hidróxido de Amonio acuoso al 10%

Fenol acuoso al 2%

Formaldehído acuoso al 40%

Acido sulfúrico, hidroclicóric, nítrico, etc.

## Preservación

Los especímenes frescos se cortan longitudinalmente y se colocan en un secador (deshidratador de alimentos) a temperaturas entre 25 y 50 grados centígrados por varias horas, el tiempo de secado depende del grosor y consistencia del hongo. El material completamente seco y debidamente etiquetado se coloca en bolsas plásticas con un poco de aire, para su posterior transporte a la institución correspondiente. La etiqueta debe incluir al menos la siguiente información:

Fecha:

Sitio de recolecta:

Número de recolector:

Identificación provisional (cuando se tiene)



## Cultivo

En el caso particular de los macrohongos, se realizan de forma esporádica algunos cultivos y aislamientos, específicamente sobre Extracto de Malta y Agar, y algunas veces utilizando Benomyl para evitar el crecimiento de hongos diferentes a los macrohongos. El medio de cultivo se prepara con 100 ml de agua destilada, 20 g de Extracto de Malta, 15 g de Agar, y 0.1 g de Benomyl suspendidos en 100 ml de agua destilada y agregado al 0.5% al agar para obtener una concentración final de 5 ppm.

Los tamaños de las cajas de petri utilizadas son de 100 x 15 y 60 x 15 mm, en condiciones totalmente estériles.

Los cultivos practicados se llevan a cabo en el campo o en el laboratorio, utilizando tejido de los especímenes, o bien esporadas directas sobre el medio de cultivo. También se utilizan las esporadas en cajas de petri estériles, de las cuales se practican diluciones y se aplican al medio de cultivo, esto directamente en el Laboratorio.

Los cultivos se revisan periódicamente, y cuando presentan contaminación en alto grado, son descartados. Los que resultan sin contaminación se mantienen en viales con medio de cultivo a temperaturas de 14 o 16 grados centígrados, o bien en viales con agua estéril dentro de un refrigerador a - 74 grados centígrados.



## Identificación

La identificación de los especímenes generalmente se lleva a cabo en dos pasos; uno es la identificación provisional que se le da a los especímenes en el campo, o bien en el laboratorio y es revisada macroscópicamente por los curadores. Otra es la identificación que se lleva a cabo con el estudio de las estructuras microscópicas y el uso de claves taxonómicas, lo cual puede llevar desde horas hasta días; dependiendo de la disponibilidad de literatura y otras colecciones disponibles, además del estudio del material que hacen nuestros expertos tanto nacionales como internacionales. También por comparación con muestras de herbario cuando el material es estéril.

El estudio microscópico incluye cortes longitudinales, radiales y tangenciales de las diferentes partes del hongo, así como la prueba con diferentes reactivos químicos como KOH al 3%, Amonio, reactivo de Melzer, entre otros; y de tinciones como Rojo Congo, Azul de Algodón, Azul de Crezil, Floxina, etc. Se debe estudiar entre otras cosas las hifas (tipo, grosor color), forma y tamaño de las esporas.



## Mantenimiento de la colección

Todos los especímenes de macrohongos que ingresan a las colecciones deben estar debidamente preservados y con una identificación, al menos provisional. Es importante aclarar, que para macrohongos, una recolección significa, una bolsa (cuando viene del campo) o una caja (cuando ya está en el Herbario) que contiene de uno a varios individuos pertenecientes a una misma especie, recolectados en una determinada fecha y lugar, y con sus respectivas notas descriptivas. Además para macrohongos, cada recolección es un testigo, con datos de lugar y descripción totalmente aparte.

Cada recolección, dependiendo del tamaño, se coloca en cajas de cartón con tapa, cuyos tamaños son principalmente (largo x alto x ancho en cm) de 9 x 5.5 x 3; 12 x 9.5 x 4; 15 x 9.5 x 5;

17.5 x 11 x 5; 19 x 14 x 5; 20 x 15 x 6.5; 23 x 16.5 x 5.5; aunque en casos especiales, puede necesitarse un tamaño adicional más grande.

Las recolecciones se pueden colocar directamente sobre la caja, envueltas en papel libre de ácido (A-F TISSUE PAPER - UNBUFF), o bien pasarlas a bolsas con cierre y colocarlos dentro de las cajas. Los tamaños de las bolsas con cierre (largo x ancho en cm) son 3 x 4; 3 x 5; 4 x 6; 5 x 8; y de (largo x ancho en mm) 165 x 155; 170 x 200; y 270 x 285.



Cuando los datos de los especímenes se encuentran en la base de datos, se obtienen las etiquetas tanto pequeñas (que se colocan dentro de la caja) como las grandes (que se pegan sobre la tapa de la caja). Las etiquetas grandes deben ser hechas sobre papel PERMA-DUR FOLDER STOCK.007 y con 5 - 6 cm de alto y 9 - 10 cm de ancho; con información de fecha, sitio de recolecta, recolector, número de colector, persona que identifica, especie, identificación (preferiblemente que incluya hasta el nivel de orden), coordenadas, altitud, y código de barras ó número consecutivo de herbario. Se debe utilizar tinta indeleble.

Las etiquetas pequeñas serán hechas sobre el mismo material y tinta que las etiquetas grandes, y con un tamaño aproximado de 1.5 - 2 cm de alto x 2.5 - 3 cm de ancho; donde se incluye el nivel taxonómico, fecha y sitio de recolecta y número de recolector.



Los especímenes, por el momento, se colocan clasificados por órdenes y rotulados en la parte externa de los anaqueles, las familias están anotadas en la parte interna de las puertas, y en cada espacio interno están los géneros y las respectivas especies (cuando las hay). Los gabinetes son de metal, de 253 cm de alto, 54.5 cm de ancho y 110 cm de fondo.

Los especímenes son revisados periódicamente, para evitar problemas de absorción de humedad, así como problemas de contaminación por otros hongos, por ácaros, etc. Además se realizan al menos 4 procesos de fumigación por año, dependiendo del tipo de sustancia utilizada, pueden ser menos al año.



## Bases de Datos

Las descripciones morfológicas de los especímenes realizadas en el campo, son ingresadas en un capturador de datos. Estos datos ingresados al capturador, serán más adelante accedidos por medio de la base de datos institucional, la cual brinda información sobre las identificaciones y datos de sitios. Las identificaciones y datos de sitios y fechas de recolecta son ingresadas por el técnico a la base de datos institucional, la cual genera etiquetas, que luego son colocadas sobre las cajas de cartón que contienen los especímenes.

Las imágenes tomadas en el campo ó en el laboratorio, son seleccionadas según enfoque, nitidez y representatividad, para ingresarlas a la Base de Datos de Imágenes institucional.

## Envío de especímenes

La salida del material, depende de la aprobación de los permisos de exportación de exportación, según las necesidades y posible uso de las colecciones.

### *a. Préstamo de especímenes*

Los especímenes podrán ser enviados en calidad de préstamo ó donación para fines de identificación u algún otro tipo de estudio taxonómico. El número de colecciones que salgan de la institución tendrá que ser aprobada por el encargado, de manera que no se dañe la colección, pero que tampoco limite el trabajo del especialista.

El período de tiempo que el especialista retendrá los especímenes, es de seis meses o resultará de un acuerdo entre el encargado y el especialista, sin embargo en caso de vencimiento del préstamo, el especialista podrá solicitar una extensión del mismo, mediante una nota escrita o comunicación directa con el encargado.

### *b. Donación de especímenes*

Es tradicional entre algunos taxónomos, que su trabajo de identificación sea recompensado con la donación de algunos especímenes de interés para ellos. En nuestro caso, es posible, que aunque el taxónomo no lo indique, podamos donarle algunos especímenes, retribuyendo y reconociendo de alguna manera la ayuda brindada. Por lo tanto, será criterio del encargado, la cantidad y calidad de especímenes que serán donados, de manera que no se dañen las colecciones de la institución.

El especialista o institución que recibe la donación, deberá devolver la fórmula de donación de especímenes a la institución, directamente a la Curadora, especificando el estado general de dichos especímenes y con la firma de la persona que recibe la donación.

## MICROHONGOS

Los microhongos forman parte del grupo de hongos que generalmente no son observables a simple vista, sino que deben usarse lentes de aumento para recolectarlos e identificarlos. Dentro de este grupo se encuentran los Oomycetes que son hongos acuáticos, terrestres y parásitos de plantas; las Royas, llamadas así debido al color rojizo de sus esporas, los Carbones, que forman masas pulverulentas de esporas negras, estos dos últimos pertenecen a los Basidiomycetes, otros los encontramos en los Ascomycetes (la mayoría) y en los hongos imperfectos.

### Recolección

- Debido a que existe una gran diversidad de microhongos, estos los podemos encontrar en muchos hábitats, por lo que no hay un método único de recolecta.
- Un factor importante en la recolecta de microhongos es dónde buscarlos. Debe tomarse en cuenta que, la mayoría viven en hábitats húmedos.
- En su mayoría los cuerpos fructíferos de los microhongos son de vida corta, o bien crecen en épocas definidas. Debido a estas características, una mayor frecuencia de los viajes de recolecta, en la misma área, podrían proveer las mejores oportunidades para encontrarlos.
- Algunos microhongos viven en hábitats específicos: folícolas (sobre hojas), otros se encuentran sobre insectos, hipógeos (bajo suelo), y otros con huéspedes específicos.
- Cuando se recolecta microhongos, es indispensable una lupa 10X, tanto para encontrarlos, como para observar detalles de los cuerpos fructíferos. Además se debe de disponer de recipientes adecuados para transportar las colecciones al laboratorio como: bolsas de papel de varios tamaños, algunos recipientes con tapa que podrían también ser útiles para especímenes delicados, la lupa, una cortadora, un formón, mazo pequeño, una cuchilla y un serrucho "rabo zorro", serán suficientes.
- Registrar los datos de recolecta es un aspecto muy importante: **localización geográfica, nombre del recolector, sustrato** (identificar cuando es posible), y **fecha**.
- Los especímenes deben ser examinados lo más pronto posible. Apuntes sobre la forma, color y textura pueden cambiar cuando el espécimen se seca. "En algunos grupos de microhongos si la revisión debe ser postergada, los especímenes deberán mantenerse frescos en una cámara húmeda, que consiste en un recipiente limpio que puede ser cajas de petri o cajas plásticas con tapa, con papel toalla húmeda en el fondo del mismo, al menos por menos de 24 horas, ya que los especímenes pueden descomponerse".



## Aislamiento

Existe una amplia variedad de técnicas que pueden ser utilizadas para aislar los diferentes grupos de microhongos. Algunos grupos, tales como los parásitos, no pueden crecer en medio artificial. Muchas especies de microhongos nunca crecen en cultivos, y si lo hacen no forman cuerpos fructíferos.

Antes de comenzar a aislar los hongos, se debe esterilizar todo el material que va a utilizarse; cajas de petri, tubos de ensayo, etc, mediante autoclave e instrumentos como escarpelos, pinzas y agujas deben sumergirse en alcohol de 95% y flamearse, sin olvidarse de limpiar el área de trabajo con cloro (hipoclorito de sodio al 5% o alcohol).

Algunas de las técnicas más comunes para aislar microhongos son:

- + *Aislamiento directo*: Algunas especies con cuerpos fructífero superficiales, como los peritecios, pueden ser transferidos directamente a un medio con agar.
- + *Cultivo de tejido*: Algunos pueden ser aislados, colocando una porción del cuerpo fructífero en un medio de cultivo. El tejido puede ser desinfectado y removérsele una capa externa con una cuchilla estéril.
- + *Descarga de esporas*: En este caso el cuerpo fructífero o una sección, se adhiere con vaselina a la tapa de la caja de petri, de manera que las esporas sean depositadas sobre la otra tapa (que posee el medio con agar) de la caja de petri, se sella totalmente dicha caja con Parafilm. Cuando las esporas son depositadas, la tapa que tiene la sección del hongo adherida es reemplazada por otra tapa totalmente estéril, y la caja junto con el depósito de esporas se sella con Parafilm.
- + *Transferencia de esporas*: Éstas pueden recogerse con una aguja estéril, (previamente introducida en agar para una mejor adhesión) y transferirlas directamente al agar.

- + *Hongos internos (endófitos)*: Semillas, hojas y tallos son buenas fuentes para tales hongos, donde se toma parte del sustrato como del hongo y son transferidos al medio de cultivo.

## Medios de Cultivo

Los medios de cultivo caen dentro de dos categorías: natural y sintéticos.

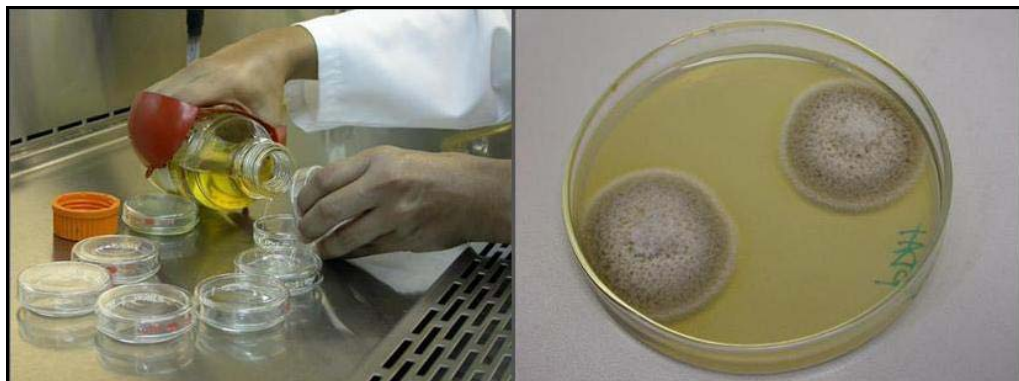
1. Los medios de cultivo naturales incluyen sustratos como trozos de madera, hierba, semillas, hojas, harina de maíz, harina de avena, y germen de trigo.
2. Los medios sintéticos son deseables donde la composición del medio puede ser conocida, éstos son importantes en estudios fisiológicos

Para la preparación de los medios de cultivo se deben llevar a cabo varios requerimientos:

Esterilización de material de cristalería, que incluye cajas de petri, tubos de ensayo, pipetas, etc., mediante calor seco (de 150 a 160 C durante una hora) o autoclave.

Es necesario que el vaciado del medio de cultivo en cajas de petri, tubos de ensayo, etc., se lleve a cabo lo más asépticamente posible, ya sea en una sala de cultivo apartada o en un lugar limpio y libre de corrientes de aire y polvo. La mesa de trabajo debe limpiarse con una solución de cloro, las manos de la persona deben estar limpias y el material de laboratorio, para impedir la introducción de microorganismos contaminantes.

Los diferentes medios de cultivo (ver apéndice I), previamente ya pesados y mezclados en agua estéril, se preparan en erlenmeyers que posteriormente se tapan con algodón y papel de aluminio, se colocan en una autoclave a 120 C y a 15 libras de presión durante 25 minutos. Los medios de cultivo esterilizados se dejan enfriar durante cierto tiempo y posteriormente se vierten en las cajas de petri. En caso de que al medio se le añada agar, se deberá dejar que este último se solidifique para que el medio de cultivo pueda entonces ser utilizado para cultivar. Para que no se contamine con bacterias se le agrega al medio de cultivo una solución antibiótica, (ver apéndice I).



Para preparar los viales, el medio de cultivo es agregado al tubo de ensayo en una cantidad apropiada y son cerrados con tapón de algodón o una tapa. Los tubos no deben de estar más de la mitad llenos. Si se usan tapas con rosca estas deben estar flojas para permitir el intercambio de gases durante el autoclavado. Una vez sacados de la autoclave los tubos son colocados sobre una tabla con la parte superior ligeramente elevada. Esto da como resultado un agar extendido que provee una mayor superficie de crecimiento para el hongo. Cuando está frío, los tubos pueden estar en forma vertical.

### **Identificación:**

Se hará una identificación provisional de los especímenes, basándose en la descripción realizada por el recolector. Posteriormente para dar certeza de que la identificación es llevada a cabo en forma correcta y detallada de los especímenes, éstos serán observados al microscopio y se utilizarán claves taxonómicas para su identificación. El estudio de estructuras microscópicas incluye el uso de reactivos químicos como el Hidróxido de Potasio al 3%, Reactivo de Melzer y tinciones como el Cotton Blue (Ver Apéndice I). Se tomarán imágenes de los cuerpos fructíferos así como de los caracteres microscópicos (ascas, esporas, paráfisis, etc), para documentar la recolecta.

La identificación puede ser llevada a cabo por el Curador, o bien por los expertos internacionales que visitan la institución, o mediante el envío de especímenes a sus respectivos museos, universidades, jardines botánicos, etc.



## Preservación

Varios métodos han sido utilizados para preservar los hongos, pero no existe un único procedimiento. El factor principal en la selección de un método de preservación es si los especímenes son mantenidos como material seco en un herbario o como cultivos vivos.

## Especímenes de Herbario

El método más común para preservar hongos es secado al aire.

Los especímenes deben estar completamente secos, ya que si permanecen húmedos permitirían el crecimiento de otros hongos y bacterias, además de ácaros que podrían destruir el espécimen.

Los patógenos de plantas y otros hongos que se encuentran sobre hospederos vivos son preservados de igual manera de como se preservan sus hospederos. Por ejemplo las especies folícolas, son preservadas, prensando y secando las hojas en el secador de plantas, mientras que los hongos sobre insectos son preservados, montando los insectos.

## Mantenimiento de la colección

El almacenaje de los hongos es usualmente hecho en sobres Glassine, éstas a la vez se colocarán en sobres de papel bond y colocadas en cajas de madera que a su vez se colocan en gabinetes bien cerrados, ordenados generalmente por Clase, Orden, Familia, Género y Especie.

Cuando la información de los especímenes se encuentre en la base de datos, se obtienen las etiquetas tanto pequeñas (que se colocan dentro de los sobres Glassine) y las grandes (que se pegan al sobre de papel). Éstas contienen la siguiente información: de fecha, sitio de recolecta,, número de recolector, persona que identifica, identificación, coordenadas, altitud, sustrato y código de barras ó número de herbario.



Los sobres Glassine tienen los siguientes tamaños: (alto x ancho en centímetros) 4.4 x 4.3, 5.9 x 9.2, 8.9 x 8.9, 7.9 x 12.9. Las cajas tienen la siguiente dimensión (alto x ancho x largo en centímetros) 10 x 33.5 x 47.5.

Las etiquetas grandes tendrán una dimensión de 8.0 x 4.5 cm y las pequeñas de 5.0 x 3.0 cm. Ambos tamaños de etiquetas deben ser hechas en papel PERMA-DUR FOLDER STOCK.007, y el tipo de cinta es "ribbon.-non bleed alcohol resistant".

Los gabinetes, tinta, etiquetas y tamaños de estas, son del mismo tipo utilizado en macrohongos.

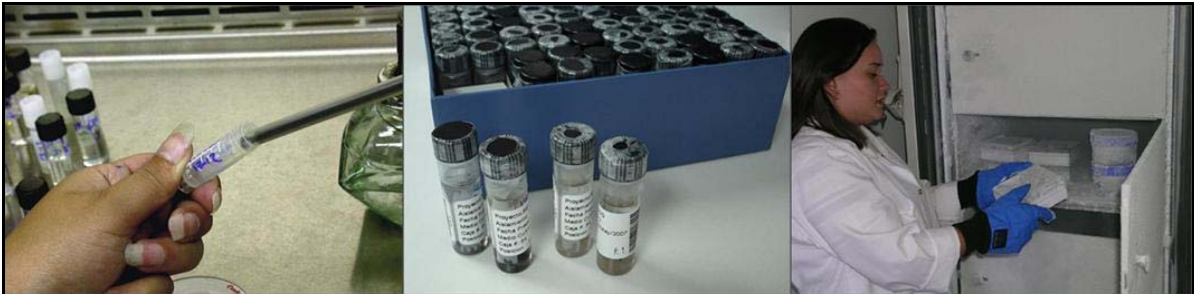
Sin importar el método utilizado, los especímenes deben ser almacenados en gabinetes bien cerrados y que puedan ser fumigados. Una amenaza para los especímenes de herbario es la humedad. A menos que sean mantenidos secos, ellos se encuentran susceptibles al ataque de otros hongos, y ácaros los cuales pueden destruirlos.



### Cultivos vivos

- Los cultivos de microhongos que se hayan podido obtener, son colocados primero sobre cajas de petri (100 x 15 mm.) conteniendo el medio apropiado (ver Apéndice I).
- De cada caja se obtienen réplicas, o sea se pasa un trocito de cultivo del hongo a otra caja, y así sucesivamente para ir obteniendo varias réplicas (unas 5) del mismo hongo.
- Las réplicas se mantienen en cajas de petri por un período de tiempo (1 a 2 meses), luego se transfieren a viales (9 ml.) con medio de cultivo.
- Los tubos una vez inoculados con los hongos, pueden ser almacenados en una incubadora a una temperatura de + - 25 C.
- Una vez que hayan crecido los hongos, estos pueden ser mantenidos a 15 C

- También se puede hacer transferencia de réplicas a tubos conteniendo agua destilada. Los cambios de cultivo, se pueden realizar cada 6 a 8 meses.
- Otro método utilizado es mantener los cultivos en un congelador a - 70 C
- Para la determinación de contaminantes se utilizará Trypticase de soya (ver Apéndice I)
- Tanto las cajas de petri como los tubos deben estar bien identificados para evitar confusión. Indicando de donde fue tomada la muestra, así como medio de cultivo utilizado, fecha de inoculación, usando etiquetas o marcados con tinta indeleble.



### Base de Datos

Los datos de las recolectas serán ingresados a la base de datos institucional. Las identificaciones y datos de sitios y fechas de colecta son ingresadas por el técnico a la base de datos institucional, la cual genera etiquetas (del mismo tamaño y forma que las usadas para macrohongos y líquenes), que luego son colocadas sobre los sobres de papel que contienen los especímenes.

Las imágenes tomadas en el laboratorio, mediante el uso del Sistema Digital de Captura de Imágenes, son seleccionadas según enfoque, nitidez y representatividad, para ingresarlas a la Base de Datos de Imágenes institucional.

### Envío de material

El sistema de envío de material, como donación ó préstamo, rige de la misma manera que la especificada para el grupo de macrohongos.

## LIQUENES

Los líquenes son una asociación simbiótica entre un hongo (micobionte) y uno o más organismos autótrofos fotosintéticos (fotobionte) que puede ser un alga verde o una cianobacteria; de esta unión resulta un talo morfológicamente diferente a cada uno de sus componentes o sea una entidad totalmente nueva. El hongo determina la naturaleza y forma de la mayoría de los líquenes y produce las estructuras reproductivas.

### Recolección

Resulta indispensable llevar a cabo el siguiente procedimiento para que las colecciones tengan valor científico:

1. Recolecta de especímenes sobre una amplia variedad de sustratos (árboles, troncos caídos, rocas, musgo, suelo, hojas, etc.); ésta actividad se lleva a cabo con una cuchilla o puñal, los cuales ayudan a retirar un fragmento del sustrato junto con el espécimen, especialmente los que viven sobre corteza o suelo (crustáceos).



2. Para recolectar los que viven sobre rocas se necesita un cincel y un mazo, mientras que una podadora es útil para cortar ramas pequeñas. Una lupa 10x es esencial para observar algunas de las características morfológicas más importantes.

3. Cuando se trata de líquenes folícolas (sobre hojas), se deben tomar las hojas enteras y someterlas al procesamiento habitual que se sigue para estos órganos vegetales

4. Registramos los datos ecológicos básicos para cada espécimen, tal como tipo del sustrato, especie del hospedero (si sabemos el nombre científico o vulgar de la planta donde recolectamos el líquen), y exposición o índice de luz (en cinco categorías: si el espécimen es recolectado en un lugar totalmente sombreado le asignamos 1; si está semi-expuesto le asignamos 3 y si lo encontramos en un sitio completamente expuesto a la luz le asignamos 5).



5. Tomar fotografías de los especímenes.



6. Las muestras recolectadas se almacenan en bolsas de papel (¡nunca de plástico!).

7. Durante la recolecta se deben tomar además los siguientes datos:

Localidad: país, provincia, cantón, área de conservación, área protegida, área privada sendero, coordenadas geográficas.

Hábitat: Descripción breve del tipo de bosque, orillas de camino, áreas de pastoreo, iluminación.

Sustrato: suelo, roca, corteza (en lo posible el nombre científico y/o vulgar del árbol), hojas (en lo posible el nombre científico y/o vulgar del árbol, arbusto, hierba, liana, etc.).

Altitud: Sobre el nivel del mar.

Fecha: Cuando se realizó la colección; especificar día, mes y año.

Recolector y número de colección: Nombre y apellido del recolector o recolectores, y el número de colección.

## Preservación

- -Los especímenes recolectados se deben secar al aire libre o con un deshidratador de alimentos a temperaturas no mayores de 40 grados centígrados.
- -Los líquenes crustáceos deben ser prensados en una prensa de las mismas que se utilizan para plantas vasculares
- -A cada espécimen es recomendable hacerle una descripción breve (color, tamaño, presencia de estructuras morfológicas, forma, etc.) junto con los datos de campo.
- -Se guarda cada espécimen en un sobre de periódico y se marca con el número de colección correspondiente al recolector

## Revisión

- -Los especímenes traídos del campo se revisan para ver si están bien secos y si no tienen ningún nivel de contaminación
- -Cada espécimen es guardado en un sobre de papel bond de aproximadamente 16 cm de largo x 11 cm de ancho y estos sobres llevan dentro una cartulina barnizable número 16 de 14.3 cm de largo x 9.5 cm de ancho
- -Los líquenes crustáceos son pegados con cola blanca sobre esta cartulina y se mantienen fuera hasta que el espécimen pegue bien y luego son guardados nuevamente dentro del sobre.
- -Todos los sobres deben tener por fuera la información correspondiente al recolector, número de colecta, sustrato e índice de luz, asignado a cada espécimen.



## Identificación

Al igual que en el grupo de los macrohongos, la identificación de los especímenes generalmente se lleva a cabo en dos pasos; uno es la identificación provisional que se le da a los especímenes en el campo, o bien cuando llega a la institución respectiva y es revisada por el Curador en el estereoscopio, observando las estructuras macroscópicas (color del talo, tamaño, forma, cuerpos fructíferos, presencia o ausencia de soledios e isidios, color de la superficie inferior y superior, presencia o ausencia de cilios, rizinas, cifelas, seudocifelas, máculas, etc.). Otra es la identificación final que se lleva a cabo con el estudio de las estructuras microscópicas y el uso de claves taxonómicas. El estudio microscópico incluye cortes verticales del talo y de los cuerpos fructíferos, los cuales pueden ser teñidos con Lactofenol Azul o Azul de Algodón para observar mejor sus componentes. El estudio microscópico también es llevado a cabo por los expertos internacionales que visitan la institución.

Los líquenes poseen una serie de componentes químicos que nos ayudan a determinar grupos complejos de especies. Estas se estudian sistemáticamente utilizando métodos sencillos o complejos que permiten detectarlas en el tejido cortical del talo o en las paredes celulares.

La quimiotaxonomía en líquenes se ha enfocado en el uso taxonómico de los datos de metabolitos a nivel de especie. Dentro de los compuestos se encuentran los llamados ácidos liquénicos y otros tipos de sustancias. Las sustancias liquénicas nunca ocurren en grandes cantidades, por lo cual su detección e identificación involucran técnicas especiales, como lo son:

-Tests de coloración: orientado exclusivamente a detectar macroscópicamente la presencia de grupos de compuestos químicos, evidenciando cambios de color (en el talo, corteza y médula). Los cambios de coloración se consideran positivos e indican la presencia de un grupo de compuestos determinados; se considera negativo si no hay cambio de color.

-Test C: se emplea como reactivo una solución acuosa saturada de hipoclorito de calcio. Como sustituto se usa un blanqueador líquido comercial con cloro activo.

-Test K: se usa como reactivo una solución acuosa de hidróxido de potasio. Esta solución se prepara al 10-25% y es más estable que el test C

-Test KC: es una mezcla de hipoclorito de calcio con hidróxido de potasio. Primero se aplica K e inmediatamente C.



### Mantenimiento de la colección

Todos los especímenes que ingresan a la colección deben estar debidamente preservados, montados en los sobres de papel bond y con una identificación, al menos provisional, se colocan en un congelador a -4 grados centígrados por una semana, como parte de la cuarentena. Luego de esto pasan a formar parte de la colección general. Aquí serán guardados en anaqueles de 1 m con 58.5 cm de largo x 69 cm de ancho.

Los especímenes en la colección están ordenados por orden alfabético.

Cuando los datos de los especímenes se encuentren en la base de datos, se obtienen las etiquetas grandes (Ver Mantenimiento de la Colección. Macrohongos).



### **Bases de Datos**

El ingreso de los datos de las recolectas e imágenes de líquenes sigue los mismos parámetros que lo anotado para Macrohongos (Ver Base de datos de Macrohongos.)

### **Envío de material**

El sistema de envío de material, como donación ó préstamo, rige de la misma manera que la especificada para el grupo de macrohongos.

## APENDICE I

### Medios de Cultivo

#### Harina de Maíz Agar (CMA)

Harina de Maíz	20 gr.
Peptona	20 gr.
Dextrosa	20 gr.
Agar	15 gr.
Agua Destilada	1 l

#### Extracto de Malta Agar (MEA)

Extracto de Malta	20 gr.
Peptona	1 gr.
Dextrosa	20 gr.
Agar	20 gr.
Agua Destilada	1.l

La peptona y la dextrosa pueden variar su proporción o ser omitidas enteramente.

#### Papa Dextrosa Agar (PDA)

Papas peladas y troceadas	200 gr.
Dextrosa	20 gr.
Agar	15 gr.
Agua Destilada	1.l

#### Jugo de Vegetales con Agar (V-8)

Jugo V-8	180 ml.
Carbonato de Calcio	2 gr.
Agar	20 gr.
Agua Destilada	1 l

#### Determinación de contaminantes

##### Tripticasa de soya (TSA)

TSA	40 gr.
Agua destilada	1 l.

### Solución antibiótica

Streptomycin	0.5-1.0 gr
Chlorotetracycline	0.5-1.0 gr
Agua esteril	50 ml

### Soluciones

Lactofenol:

Fenol	20 ml.
Acido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Agua Destilada	20 ml

Reactivo de Melzer

Cristales de iodo	0.5 gm.
Ioduro de Potasio	1.5 gm.
Chloral hydrate	20 gm.
Agua Destilada	20 ml.

Hidroxido de Potasio al 2-3%

### Tinciones

Cotton blue (azul de algodón) y Floxina, ambas al 0.5% en solución acuosa

### Otros métodos de preservación:

- \* Refrigeración
- \* Almacenaje en Nitrógeno líquido
- \* Liofilización