



ORIGINAL

Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina



Alejandra Concepción Gutierrez^a, Julieta Tornesello-Galván^a,
Romina Guadalupe Manfrino^a, Marcela Hipperdinger^b, Marianel Falvo^a,
Celeste D'Alessandro^a y Claudia Cristina López Lastra^{a,*}

^a Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) UNLP-CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina

^b Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) UNLP-CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 19 de febrero de 2016; aceptado el 24 de septiembre de 2016

Disponible en Internet el 18 de marzo de 2017

PALABRAS CLAVE

Hongos;
Colección;
Preservación;
Cultivos;
Insectos;
Artrópodos

Resumen La colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores es única por sus características específicas en la Argentina y por preservar hongos en cultivo, *in vitro* e *in vivo*. Esta colección está abierta para actividades de investigación, docencia, servicios y asesoramiento público y privado. Un total de 421 aislamientos pertenecientes a 23 géneros (*Ascomycota*: 16, *Entomophthoromycotina*: 4 *Glomeromycota*: 2 y *Oomycota*: 1) son preservados en la colección mediante diversos métodos: criopreservación en freezer a -20°C y -70°C , agua destilada estéril, papel, arena y liofilización. Las cepas que integran la colección fueron aisladas de insectos y de otros artrópodos; y a partir de suelo (usando insectos trampa o aislamiento directo en medios selectivos). La identificación se realizó mediante estudios de caracterización morfológicos y, en algunos casos, por taxonomía molecular. Esta colección se utiliza como centro de referencia para identificación de especies, certificaciones, estudios de investigación y docencia, transferencia tecnológica, servicios a terceros, depósito de cepas y preservación de la diversidad y conservación del germoplasma. Las cepas preservadas son, en su mayor parte, nativas de distintas regiones de la Argentina. La colección fue originada en el año 1988 y está registrada en la base de la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos y en la World Federation of Culture Collections.
© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: claudia@cepave.edu.ar (C.C. López Lastra).

KEYWORDS

Fungi;
Collection;
Preservation;
Cultures;
Insects;
Arthropods

Organization and preservation of the collection of pathogenic and fungal symbionts of insects and other arthropods from CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina

Abstract The collection of fungal pathogens and symbionts of insects and other arthropods of the Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, La Plata, Argentina, is unique because it preserves *in vivo* and *in vitro* cultures of fungal pathogens. This culture collection is open for research, teaching, consulting services, and strain deposit. It contains 421 strains belonging to 23 genera (16 *Ascomycota*, 4 *Entomophthoromycotina*, 2 *Glomeromycota* and 1 *Oomycota*), and the cultures are preserved by different methods such as cryopreservation in freezer at -20°C and -70°C , paper, distilled water and lyophilization. Fungi were isolated from insects, other arthropods, and soil (by using insect baits and selective media). Species were identified by morphological features and in a few strains by molecular taxonomy (PCR of rDNA). This collection is a reference center for species identification/certifications, research and teaching purposes, strain deposit, transference and consultancy services, and its overall goal is to preserve the fungal germplasm and *ex situ* diversity. Most of the strains are native of Argentina. The collection was originated in 1988 and is registered in the Latin American Federation for Culture Collections and in the World Federation of Culture Collections.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Las colecciones de cultivos de microorganismos tienen gran importancia para la conservación del recurso genético y de la diversidad, y constituyen fuentes de referencia, certificación, investigación y docencia. Asimismo, mediante estas colecciones se brindan servicios de asesoramiento y de transferencia del conocimiento científico y tecnológico al sector público y privado. La función principal de las colecciones es la conservación de cultivos microbianos axénicos, sin alteraciones genéticas o mutaciones, ni cambios morfológicos o fisiológicos. Las colecciones deben permitir la preservación de las cepas en un estado estable y asegurar su viabilidad a largo plazo²². En la Argentina existen 19 colecciones registradas en la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos⁵, que incluyen bacterias y hongos (hongos filamentosos y levaduras). Estas colecciones son dependientes, en su mayoría, de universidades u otras instituciones nacionales.

Para poder mantener y conservar una colección de microorganismos, en particular una de cultivos de hongos, se requiere una constante atención y vigilancia para preservar las características morfológicas macro y microscópicas de las cepas. Es fundamental conocer las condiciones de crecimiento y temperaturas apropiadas, las propiedades bioquímicas y las necesidades fisiológicas de cada microorganismo, así como también los métodos de preservación más favorables para su conservación y mantenimiento en el tiempo¹⁸. Los objetivos primordiales que persigue la conservación de cepas de hongos son el mantenimiento de la pureza, de la viabilidad y de la estabilidad morfológica y genética⁹.

La colección de hongos patógenos y simbiontes de insectos y otros artrópodos descrita en este estudio es una colección específica que funciona en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CONICET-UNLP), que

tiene por finalidad preservar y conservar la diversidad de los aislamientos de especies de hongos entomopatógenos y simbiontes de artrópodos (principalmente insectos) a través del tiempo, sin modificar sus características fenotípicas. Las cepas preservadas en esta colección son nativas y proceden de diversas áreas geográficas, entre ellas, áreas naturales protegidas, sistemas agrícolas, sistemas acuáticos, etc. Esta colección de cultivos, además, aporta continuamente el recurso genético necesario para el desarrollo de diferentes líneas de investigación que pertenecen al CEPAVE. Estas líneas incluyen la interacción hongo-insecto y hongo-artrópodo, estudios de la actividad biológica, estudios de sus metabolitos, caracterización molecular de las especies fúngicas y de sus cepas, producción masiva y estudios epizootiológicos. Los usos posibles de los cultivos de hongos incluyen el desarrollo de insecticidas microbianos o de metabolitos antimicrobianos para su futura aplicación en la industria farmacéutica, agrícola y otras^{19,20}.

Finalmente, colecciones como aquella de la que dispone el CEPAVE no solo permiten la preservación y la conservación del recurso genético, sino también la continuidad del trabajo científico a largo plazo y el desarrollo tecnológico para su posible aplicación en el control biológico de insectos y otros artrópodos considerados plaga. Los objetivos del presente trabajo son describir los alcances y el estado actual de la colección y los métodos de preservación utilizados.

Materiales y métodos

Características de la colección de hongos entomopatógenos y simbiontes del CEPAVE

La colección fue iniciada en 1988 con material aislado de insectos (contando originalmente con 25 aislamientos de aproximadamente 9 especies). Actualmente, cuenta con

una micoteca de 421 aislamientos pertenecientes a 23 géneros diferentes (tabla 1). La mayor parte de la colección está compuesta por *Ascomycota* representados por el Orden *Hypocreales*, con un predominio de los géneros *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Isaria* spp. y *Lecanicillium* spp. Dentro del Orden *Entomophthorales* (*Entomophthoromycotina*), se encuentran en mayor número los géneros *Pandora* spp. y *Zoopthora* spp. (tabla 1). Las cepas proceden de relevamientos realizados durante 25 años y en otros casos son producto del muestreo de campo realizado para los trabajos de las tesis doctorales y publicaciones científicas.

La colección de cultivos dispone de un reglamento propio y de un manual de control de calidad, además se establecen los acuerdos de transferencia de materiales establecidos para las colecciones de cultivos¹⁷. La acronimia de esta colección es CEP y está registrada en la World Federation for Culture Collections (WFCC) con el número de registro 973, en la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC), registro S1-06, y se encuentra en proceso de registro en el Sistema Nacional de Datos Biológicos (SNDB).

La colección se ha establecido de acuerdo con los requerimientos especificados por la WFCC²⁵. Para la sistematización se han confeccionado fichas que corresponden a cada cepa e incluyen los datos de fecha de recolección; hospedante/sustrato; localidad, provincia/estado, país; nombre del recolector; ambiente; coordenadas geográficas; fecha de aislamiento; medio de cultivo en el cual se aisló; nombre de quien identificó la especie y del legít; y métodos de identificación y de preservación. Los datos de referencia se encuentran sistematizados en una base de datos que se actualiza en forma permanente y a la que se puede acceder por género, especie fúngica o especie/género del hospedante. El acceso a la colección a través de los buscadores estándares será posible mediante la digitalización de la colección en un *blog* que está en etapa de diseño.

Métodos de aislamiento e identificación taxonómica

Los aislamientos fueron obtenidos de los relevamientos desarrollados a campo desde el año 1988 hasta el presente. Los muestreos fueron planificados y realizados considerando el tipo de ambiente, de sustrato y de artrópodos hospedantes^{13,24}. Las cepas fúngicas han sido aisladas directamente de insectos, o de otros artrópodos infectados^{16,23}. Asimismo, un número importante de cepas se han obtenido a partir de muestras de suelo, lo que fue posible gracias a la condición de muchas especies fúngicas de tener una etapa de su ciclo de vida saprofito. Los aislamientos de muestras de suelo se obtuvieron mediante el método *in vivo*, con insectos cebo o trampa, o *in vitro*, a través de un medio de cultivo selectivo²¹. La mayoría de los aislamientos se han preservado como monospóricos, para evitar la variabilidad genética y mutaciones a largo plazo.

La identificación taxonómica se realizó de acuerdo con los caracteres morfológicos en cultivo, en el hospedador o en ambos mediante las claves y monografías citadas previamente¹⁰. En algunos casos, la identificación morfológica se complementó con el análisis molecular utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se han caracterizado las regiones ribosomales ITS1, 5.8 S e ITS2, la primera parte del gen 28S del ARNr o subunidad

grande (LSU) ARNr, y una parte del gen de la deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato (GPD), entre otros, de acuerdo con las especies consideradas en los casos de identificación por taxonomía molecular^{3,11}.

Métodos de preservación

Desde 1988 hasta 2008, las cepas fueron preservadas mediante el método de repique sucesivo, a partir de entonces se incorporaron otros métodos de preservación. La transferencia periódica o repique consistió en guardar un cultivo activo en tubos de vidrio en «pico de flauta» o «en estría» en el medio seleccionado. Luego de que el cultivo creció, se mantuvo a 4 °C para alargar el período entre repiques. La preservación en agua destilada estéril, método modificado de Bueno y Gallardo², consistió en cortar cubos de 1 cm³ de un cultivo esporulado y colocarlos dentro de un tubo de centrífuga de 15 ml de polipropileno esterilizado, que contenía 10 ml de agua destilada estéril. Cada tubo se conservó en la heladera a 4 °C. El método de preservación de cultivos en papel fue modificado y adaptado de la técnica descrita por Fong et al.⁷. Se colocaron tiras de papel de filtro Whatman N.º 4 de 2 mm × 50 mm (previamente esterilizadas en autoclave durante 20 min a 120 °C y secadas en estufa) sobre cultivos esporulados; estas se dejaron durante 60 min. Posteriormente, se dejaron secar bajo cámara de flujo laminar y se conservaron en heladera a 4 °C en sobres de papel (15 cm × 15 cm), esterilizados o dentro de tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf (1,5 ml) estériles. Para el método de congelación de los cultivos en *freezer* a -20 °C y a -70 °C, se realizaron cortes de cubos de 1 cm³ de un cultivo esporulado, que luego fueron colocados dentro de frascos estériles de 1,5 ml que contenían glicerol estéril al 10% (utilizado como crioprotector)^{14,15}.

El método de desecación de los cultivos en arena consistió en preparar una suspensión de un cultivo esporulado y colocar 1 ml de esta en 4 g del sustrato dentro de un tubo Eppendorf estéril. Luego se dejó secar en estufa. Dependiendo de la especie fúngica, estos cultivos se pueden conservar a -20 °C o a temperatura ambiente. La conservación por liofilización es un método estándar usado para muchos hongos, que consiste en extraer toda el agua de un cultivo y preservar el material fúngico en ampollas cerradas al vacío, a 4 °C. Si bien nuestra colección no cuenta con el equipo, algunos cultivos han sido preservados por este método mediante la colaboración de otra institución¹⁰.

Viabilidad

Los controles de viabilidad se realizaron al inicio del proceso (tiempo 0), al mes, a los 6 meses y a los 12 meses, de acuerdo con la técnica citada previamente¹². Se consideró viable un cultivo cuando hubo crecimiento, se observaron los caracteres macroscópicos y microscópicos. Asimismo, para evitar la pérdida de las características de patogenicidad y virulencia de los aislamientos fúngicos, se inocularon insectos sanos procedentes de crías artificiales mantenidas en el CEPAVE. Para estas pruebas, los insectos fueron seleccionados sobre la base de su susceptibilidad hacia las especies fúngicas, se utilizaron larvas de *Galleria melonella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) o de *Tenebrio molitor* (*Coleoptera: Tenebrionidae*).

Tabla 1 Descripción de los hongos presentes en la colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del CEPAVE

Género	Medio de cultivo de preferencia	Método de preservación	Cepas preservadas	Hospedador ^a /sustrato
<i>Alternaria</i>	AM 2%/SDYA	A/P	3	<i>Hemiptera/Araneae</i>
<i>Aphanocladium</i>	AM 2%/SDYA	A	2	<i>Hemiptera</i>
<i>Arthirinium</i>	AM 2%/SDYA	A	1	<i>Hemiptera</i>
<i>Aschersonia</i>	AM 2%/SDYA	Fr. -20 °C	1	<i>Hemiptera</i>
<i>Aspergillus</i>	AM 2%/SDYA	A	10	<i>Hemiptera/Lepidoptera</i>
<i>Beauveria</i>	SDYA 1/4/AM 2%	A/P/Fr. -20 °C, Fr. -70 °C/Are.	107	<i>Coleoptera/Diptera/Hemiptera/Lepidoptera/Dermoptera/Hymenoptera/Phasmatodea/Araneae/suelo</i>
<i>Cladosporium</i>	AM 2%/SDYA	A/P	4	<i>Hemiptera</i>
<i>Clonostachys</i>	AM 2%/SDYA	A/P	2	<i>Hemiptera</i>
<i>Conidiobolus</i>	SDYA	A/P	3	<i>Diptera</i>
<i>Erynia</i>	SDYA	A/P	1	<i>Diptera</i>
<i>Fusarium</i>	AM2%/SDYA	A/P	11	<i>Diptera/Hemiptera</i>
<i>Isaria</i>	SDYA 1/4/AM 2%	A/P/Fr. -20 °C/Fr. -70 °C	40	<i>Hemiptera/Hymenoptera/Phasmatodea/Araneae/suelo</i>
<i>Lecanicillium</i>	SDYA 1/4/AM 2%	A/P/Fr. -20 °C/Fr. -70 °C	39	<i>Hemiptera/Araneae</i>
<i>Leptolegnia</i>	YPSS	A	3	<i>Diptera</i>
<i>Metarhizium</i>	SDYA 1/4/SMYA	A/P/Fr. -20 °C/Fr. -70 °C/Are./Li.	109	<i>Battodea/Hemiptera/Coleoptera/Lepidoptera/suelo</i>
<i>Mucor</i>	AM 2%/SDYA	A	5	<i>Hemiptera/Diptera</i>
<i>Pandora</i>	SDYA enriquecido con yema de huevo	Fr. -70 °C	16	<i>Hemiptera (Aphididae)</i>
<i>Penicillium</i>	AM2%/SDYA	A/P	21	<i>Diptera/Hemiptera</i>
<i>Phoma</i>	AM 2%/SDYA	A/P	1	<i>Hemiptera</i>
<i>Purpureocillium</i>	AM 2%/SDYA	A/P/Fr. -20 °C/Fr. -70 °C	11	<i>Coleoptera/Hymenoptera</i>
<i>Smittium</i>	AM 2%/SDYA	A/P	13	<i>Diptera</i>
<i>Staphylotrichum</i>	AM 2%/SDYA	A/P	1	<i>Hemiptera</i>
<i>Zoopphthora</i>	SDYA	Fr. -70 °C	16	<i>Lepidoptera/Hemiptera</i>
		Total	421	

AM: agar extracto de malta; SDYA: agar Sabouraud dextrosa con extracto de levadura; YPSS: medio Emerson agar con extracto de levadura; SMYA: agar Sabouraud maltosa con extracto de levadura; A: agua destilada estéril; Are.: arena; P: papel de filtro; Fr. -20: freezer a -20 °C; Fr. -70: freezer a -70 °C; Li.: liofilización.

^a El hospedador se cita a nivel de Orden.

Tabla 2 Iniciadores para identificar las especies presentes en el género *Isaria*

Especies ^a	Genes	Marcador molecular	Tamaño del producto (pb)
<i>Isaria farinosa</i> (4); <i>I. fumosorosea</i> (17); <i>I. javanica</i> (1)	EF1- α	983F 5'-GCYCCYGGHCAYGGTGAYTTYAT-3'	1000
	ITS-5,5.8 rDNA,ITS2	2218R 5'-ATGACACCRACRGCACRGTYTG-3' TW81F 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3' AB28R 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'	500

^a Representa la cantidad de cepas analizadas.

Resultados y discusión

Si bien la colección surgió como una necesidad de preservar los cultivos fúngicos para el uso de las líneas de investigación que se encuentran en el CEPAVE, actualmente es una colección de referencia, tanto para el sector público como privado, y continuamente aporta conocimiento e interacción con empresas e instituciones científicas. La colección cuenta actualmente con 421 cepas preservadas (tabla 1). El mayor porcentaje de cepas preservadas corresponden a especies incluidas en los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*, con un 25,9 y un 25,4%, respectivamente. Las técnicas de preservación utilizadas se han ido modificando a lo largo del tiempo según las necesidades de la colección y a partir del 2009 se incorporaron diferentes métodos de preservación.

Desde hace 7 años ya no se utiliza en esta colección el «repique» o método de preservación de transferencias sucesivas en medios de cultivo, debido a su costo y a que este ocasionó la pérdida de características esenciales para este tipo de hongos, como la patogenicidad, la virulencia o la capacidad de esporular en medio de cultivo. Como característica relevante debemos destacar la necesidad de disponer de crías artificiales de insectos en el laboratorio, para poder activar la virulencia de los aislamientos a través de infecciones experimentales. Actualmente, el 90% del material de la colección está preservado en igual proporción en papel, agua destilada y freezer a -20°C (tabla 1), en menor porcentaje está preservado en freezer a -70°C (4%), en arena (3%) y liofilizado (3%). A lo largo del tiempo, en esta colección se han aislado y preservado una gran diversidad de hongos, el mayor porcentaje de cepas se han aislado de suelo y de insectos, en su mayoría pertenecientes a los órdenes *Hemiptera* y *Coleoptera* (tabla 1). En cuanto a la metodología de preservación utilizada, en esta colección hemos observado mayor coincidencia con los resultados presentados por colecciones de hongos de importancia médica^{6,18}.

La utilización de herramientas moleculares nos permitió diferenciar a través de PCR-RFLP usando los genes EF1-a y ITS1-5.8-ITS2 ciertas especies problema, como *Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, *Isaria tenuipes* y *Purpureocillium lilacinum* (tabla 2), ya que las características morfológicas para identificar al género *Isaria* con frecuencia no definen claramente a nivel de especie los aislamientos nuevos³.

En cuanto a los trabajos citados previamente sobre colecciones de cultivos fúngicos, la mayoría corresponde a hongos de importancia médica^{17,18}. Con respecto a los hongos entomopatógenos, Estrada y Velez⁴ describen colecciones de

similares características en Colombia. No obstante, existen catálogos de cultivos de hongos entomopatógenos a nivel mundial, como por ejemplo ARSEF y EMBRAPA^{1,8}. En Latinoamérica existen 51 colecciones de cultivos microbianos registradas en la FELACC, de las cuales solo 19 corresponden a cultivos fúngicos de la Argentina⁵. Con este trabajo damos a conocer el estado actual de una de las colecciones de cultivos micológicos que existen en la República Argentina y en Latinoamérica.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), a la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por otorgar subsidios parciales para investigaciones, lo que ha financiado parcialmente este trabajo. Al Dr. Richard Humber, por brindar su colección para la preservación alternativa de algunas de las cepas de esta colección. Al Sr. Jorge Chayle, por colaborar con la organización de la base de datos.

Bibliografía

1. ARSEF catálogo. 2014. USDA-ARS Biological Integrated Pest Management Research. Ithaca, New York, USA. [consultado 14 Sep 2016]. Disponible en: <http://www.>

- ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80620510/ALL%20AVAIL%20indices%2016Jan014.pdf
2. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol.* 1998;15:166–8.
 3. D'Alessandro CP, Jones L, Humber RA, López Lastra CC, Sosa Gómez DR. Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. Strains (*Ascomycota: Hypocreales*) using ITS1- 5.8S-ITS2 and elongation factor alpha 1- sequences. *J Basic Microbiol.* 2013;53:1–11.
 4. Estrada MN, Vélez PE. Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos. Manejo integrado de plagas y agroecología (Costa Rica). 2003;70:97–103.
 5. Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC). Boletín 2015, N.º 18. [consultado 10 Sep 2016]. Disponible en: www.aam.org.ar/src/img_up/25112015.0.pdf
 6. Fernández Andreu CM, Martínez Machin G, Perurena Lancha MR, Illnait Zaragoza MT, Valdés Hernández I. La colección de cultivos de hongos del Instituto Pedro Kouri: funciones y retos. *Rev Cubana Med Trop.* 2005;57:208–14.
 7. Fong YK, Anuar S, Lim HP, Tham FY, Sanderson FR. A modified filter paper technique for long term preservation of some fungal cultures. *Mycologist.* 2000;14:127–30.
 8. Sosa-Gómez D, da Silva JJ. Fungos entomopatógenicos: catálogo de aislados. Londrina Embrapa Soja. 2002, n.º 199. p. 32. [consultado 13 Sep 2016]. Disponible en: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/60080/1/Documentos-188.pdf>
 9. García López MD, Uruburu Fernández F. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM.* 2000;30:12–6.
 10. Humber RA. Preservation of entomopathogenic fungal cultures. En: Lacey L, editor. *Manual of techniques in invertebrate pathology.* 2nd ed. San Diego: Ac. Press; 2012. p. 317–27.
 11. Jensen A, Eilenberg J, López Lastra CC. Differential divergences of obligately insect-pathogenic *Entomophthora* species from fly and aphid and fly hosts. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;300:180–7.
 12. Lane BS, Humphreys AM, Thompson K, Trinci APJ. ATP content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as a criterion of spore viability. *Mycol Res.* 1988;90:109–48.
 13. López Lastra CC, Steciow MM, García JJ. Registro más austral del hongo *Leptolegnia chapmanii* Oomycetes: *Saprolegniales*, como patógeno de larvas de mosquitos (*Diptera: Culicidae*). *Rev Iberoam Micol.* 1999;16:143–5.
 14. López Lastra CC, Hajek AE, Humber RA. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Can J Bot.* 2000;80:1126–30.
 15. López Lastra CC, Hajek AE, Humber RA. Effects of two cryopreservation techniques on viability and pathogenicity of entomophthoralean fungi. *Can J Bot.* 2001;79:861–4.
 16. Manfrino RG, Hatting JL, Humber R, Salto CE, Lopez Lastra CC. Natural occurrence of entomophthoroid fungi (*Entomophthoromycota*) of aphids (*Hemiptera: Aphididae*) on cereal crops in Argentina. *Ann Appl Biol.* 2013;164:151–8.
 17. Montes de Oca N, Gonzáles RA, Riverón Y, Nuñez A, Villoch A, Rodríguez N. Establecimiento y desarrollo de la colección de cultivos del CENSA. *Rev Salud Anim.* 2008;30:17–24.
 18. Panizo MM, Reviakina V, Rodríguez-Lemoine V, Dolande M, Alarcón V, Ferrara G, García N, Gonzalez G. Micoteca del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel: 60 años preservando la diversidad fúngica de interés médico en Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2015;35:4–12.
 19. Ravindran K, Chitra S, Wilson A, Sivaramakrishnan S. Evaluation of antifungal activity of *Metarhizium anisopliae* against plant phytopathogenic fungi. En: Kharwar RN, Upadhyay RS, Dubey NK, Raghuvanshi R, editores. *Microbial diversity and biotechnology in food security.* Chapter 22. New Delhi, India: Springer; 2014. p. 251–5.
 20. Rueda-Páramo ME, Manfrino RG, Gutierrez A, López-Lastra CC, García JJ. Development of the mosquito pathogen *Leptolegnia chapmanii* (*Straminipila: Peronosporomycetes*) on an inexpensive culture medium based on sunflower seed. *Biocontrol Sci Technol.* 2015;26:435–9.
 21. Schapovaloff ME, Alves LFA, Urrutia M, López Lastra CC. Ocurrencia natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2015;47:138–42.
 22. Smith D, Onions AHS. The preservation and maintenance of living fungi. Slough, Reino Unido: Commonwealth Agricultural Bureaux; 1983. p. 51.
 23. Toledo AV, Virla E, Humber RA, Paradell SL, López Lastra CC. *Clonostachys rosea* (*Deuteromycota: Hyphomycetes*) a new record for *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (*Hemiptera: Cicadellidae*) in Argentina. *J Invertebr Pathol.* 2006;92:7–10.
 24. Toledo AV, Humber RA, López Lastra CC. First and Southernmost records of *Hirsutella* (*Ascomycota: Hypocreales*) and *Pandora* (*Zygomycota: Entomophthorales*) species infecting *Dermaptera* and *Psocodea*. *J Invertebr Pathol.* 2008;97:193–6.
 25. World Federation Collection Culture (WFCC). Information document on access to ex-situ microbial genetic resources within the framework of the Convention on Biological Diversity. Biodiversity Committee. [consultado 15 Sep 2016]. Disponible en: <http://wcdm.nig.ac.jp/wfcc.html>