

NOTA CORTA

VIABILIDAD DE CEPAS DE *VOLVARIELLA VOLVACEA*
CONSERVADAS EN NITRÓGENO LÍQUIDO

ROSALÍA PÉREZ Y
DULCE SALMONES

Instituto de Ecología, Departamento de Hongos,
Apartado Postal 63, Xalapa, Ver., 91000 México

ABSTRACT

VIABILITY OF *VOLVARIELLA VOLVACEA* STRAINS STORED IN LIQUID NITROGEN. *Rev. Mex. Mic.* 13: 78-80 (1997). In this paper, results of the recuperation of 11 strains of *Volvariella volvacea* (Bull: Fr.) Sing. stored in liquid nitrogen are given. For cryopreservation, the mycelia were inoculated on seed of millet and two varieties of sorghum and put in cryovials and placed in contact with a cryoprotector solution of dimethyl sulfoxide (DMSO) 5% for 30, 60 and 90 min. The strains were maintained in liquid nitrogen for two weeks. The samples were then thawed out and mycelial recuperation evaluated by daily observations under the microscope. The millet seeds with 60 and 90 minutes of contact with DMSO proved to be the best treatments for strain cryopreservation.

Key words: *Volvariella volvacea*, cryopreservation.

RESUMEN

Se presentan los resultados de recuperación de 11 cepas de *Volvariella volvacea* (Bull: Fr.) Sing. conservadas en nitrógeno líquido. Para la criopreservación, los micelios se inocularon en semillas de mijo y dos variedades de sorgo y se depositaron en crioviales, poniéndose en contacto con una solución crioprotectora de dimetil sulfóxido (DMSO) al 5%, durante 30, 60 y 90 min. Las cepas permanecieron en nitrógeno líquido dos semanas. Posteriormente las muestras se descongelaron, evaluándose la recuperación de los micelios mediante observaciones microscópicas diarias. Las muestras sometidas a 60 y 90 minutos de tiempo de contacto con DMSO resultaron ser los mejores tratamientos para la criopreservación de las cepas.

Palabras clave: *Volvariella volvacea*, criopreservación.

Las resiembras periódicas de las cepas microbianas inducen cambios físicos y genéticos que aumentan el riesgo de pérdida del material biológico (Ghera, 1984; Sharp, 1984). Debido a lo anterior, la conservación de cepas en ultracongelación (-196 °C) se considera un método altamente ventajoso, ya que al disminuir el metabolismo del organismo, su almacenamiento es por tiempo ilimitado y consecuentemente, disminuye la posibilidad de alteraciones en sus características genéticas (Hwang, 1968; Butterfield *et al.*, 1978; Jong, 1978; Elliot y Challen, 1979; Jodon *et al.*, 1982; San Antonio y Hwang, 1982; Smith, 1982; Jong y Birmingham, 1992). Esta técnica ha sido recomendada para organismos que no esporulan y que

por tanto, (Hwang y San Antonio, 1972; Hwang *et al.*, 1976).

En México, los estudios sobre criopreservación de cepas de hongos se iniciaron recientemente y han sido enfocados principalmente a los géneros *Pleurotus* y *Lentinus* (García-Hinojosa y Martínez-Cruz, 1991; Mata *et al.* 1994; Ortega y Mata, 1994; Lara Herrera *et al.* 1997), sin considerar otras especies comestibles de interés comercial.

Debido a lo anterior y con el objetivo de evaluar la recuperación de cepas del hongo comestible *Volvariella volvacea* sometidas a ultracongelamiento, 11 cepas depositadas en la Colección de Hongos Comestibles del Instituto de Ecología de Xalapa

(México), se sembraron en medio de cultivo de agar con extracto de malta e incubaron a 30 °C. Paralelamente se hidrataron semillas de sorgo rojo (*Sorghum vulgare* Pers.), mijo (*Setaria geniculata* (Lam.) P. Beauv) y sorgo negro (*Sorghum alnum* Parodi), que se colocaron en cajas de Petri y se esterilizaron a 15 lbs durante 45 min. Los granos fueron inoculados con las cepas de *Volvariella* e incubados a 30 °C en la obscuridad, hasta que el micelio los cubrió totalmente.

Para la criopreservación de las cepas se empleó la técnica de Hwang (1960) modificada por Mata *et al.* (1994), que consistió en llenar 2 crioviales por tratamiento con 1.2 ml de solución de dimetil sulfóxido al 5% e introducir 10 semillas con micelio en cada uno, permitiendo que las muestras estuvieran en contacto con la solución crioprotectora durante 30, 60 y 90 min. En total se preservaron 1980 muestras. Una vez transcurrido el tiempo de contacto, los crioviales se colocaron en una caja de policarbonato que se introdujeron al contenedor con nitrógeno líquido.

Quince días después los crioviales se descongelaron sumergiéndolos durante 10 min en agua a 30 °C y, las semillas con micelio se transfirieron a cajas de Petri estériles para escurrir el exceso de la solución crioprotectora. Enseguida y con ayuda de una pinza estéril, los granos fueron inoculados sobre placas de agar con extracto de malta (10 en cada caja) e incubados a 30 °C. La recuperación de los micelios se determinó mediante observaciones al microscópio de las muestras, considerándose recuperadas aquellas que presentaban crecimiento micelial. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza para un diseño factorial en bloques, para determinar si entre las cepas, semillas y tiempo de contacto empleados existió alguna diferencia significativa.

En cuanto a los resultados, el tiempo de recuperación de las muestras fue variable, siendo las cepas IE-50, IE-88 e IE-158 las más veloces, ya que el 50% del total de sus muestras presentaron crecimiento micelial a las 24 h de incubación, en contraste con las cepas IE-35, IE-164 e IE-166 que permanecieron con 0% de recuperación en el mismo tiempo de incubación. Los porcentajes de las cepas restantes fluctuaron entre 5 al 38%.

Referente a las semillas evaluadas, las cepas desarrollaron abundante crecimiento micelial en los 3 sustratos probados, siendo que las muestras de sorgo

rojo y mijo se recuperaron al 100% en 3 días de incubación y las de sorgo negro a los 4 días; estos valores de recuperación son significativamente mayores a los reportados por Lara *et al.* (1997) en cepas de *Pleurotus* spp., y Ortega y Mata (1994) en *Lentinus* spp., quienes bajo las mismas condiciones de preservación alcanzaron porcentajes de 60-70 y 50% respectivamente. Por otra parte y con respecto a los tiempos de contacto evaluados, los mayores porcentajes de muestras recuperadas a las 48 h de incubación correspondieron a 60 y 90 min de contacto con el crioprotector, con excepción de la cepa IE-164 que fue a 30 min (Fig. 1).

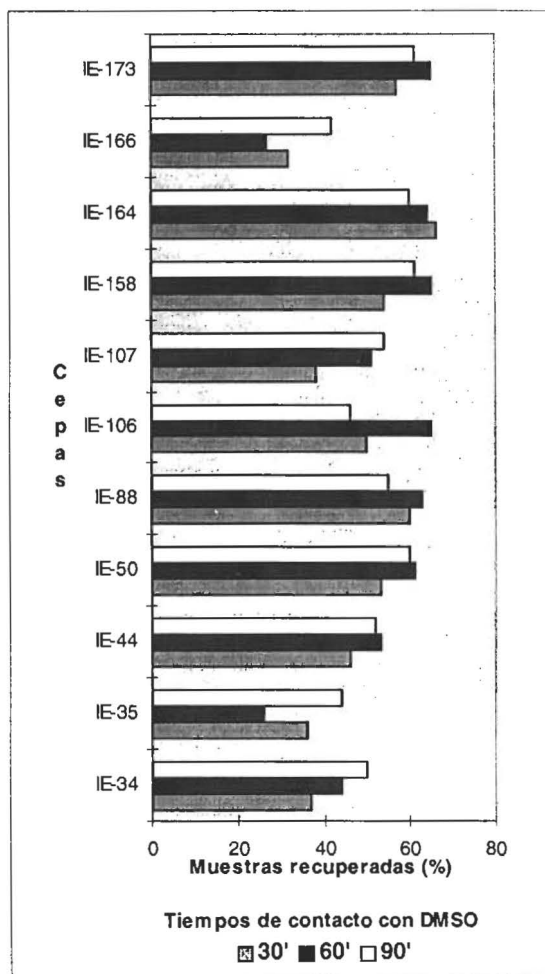


Fig. 1. Porcentaje de muestras recuperadas de *Volvariella volvacea* a las 48 h de incubación, en los diferentes tiempos de contacto evaluados.

Finalmente, ya que el análisis estadístico aplicado no detectó diferencias significativas entre las cepas, semillas y tiempos de contacto probadas, se concluye que la criopreservación de cepas de *Volvariella* empleando semillas de gramíneas como soporte y aplicando 30 a 90 min de tiempos de contacto con la solución de DMSO al 5%, es un método adecuado para la conservación de los micelios sin sufrir daño alguno, aunque se recomienda emplear 60-90 min de contacto para alcanzar una recuperación total de las muestras en menor tiempo de incubación.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a las autoridades del CONACYT (proyecto 4748-N9406) y del Instituto de Ecología, su financiamiento para realizar el estudio.

Literatura citada

- Butterfield, W., S.C. Jong y M.T. Alexander, 1978. Polypropylene vials of preserving fungi in liquid nitrogen. *Mycologia* 70: 1122-1124.
- Elliot, T.J. y M.P. Challen, 1979. The storage of mushroom strain in liquid nitrogen. *Annual Rep. Glasshouse Crops Res. Inst.*: 194-204.
- García-Hinojosa, C.A. y J. Martínez-Cruz, 1991. Estudio comparativo de la eficiencia de los métodos de conservación a corto y largo plazo aplicados a hongos filamentosos. **IV Congreso Nacional de Micología**. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Tlax., 14-18 de octubre, 1991. Memorias p.130
- Gherna, R.L., 1984. Preservation. In: *Manual of methods for general Bacteriology*. American Society of Microbiology.
- Hwang, S.W., 1960. Effects of ultra-low temperature on the viability of selected fungus strain. *Mycologia* 52: 227-229.
- Hwang, S.W., 1968. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. I. An evaluation of liquid nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures. *Mycologia* 60: 613-621.
- Hwang, S.W. y J.P. San Antonio, 1972. Stability of spawn stock of the cultivated mushroom after 26 months liquid nitrogen refrigeration (-160°C to -196°C). *Mushroom Science* 8: 35-42.
- Hwang, S.W., W.F. Kwolek y W.C. Haynes, 1976. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. III. Viability and growth rate of mycelial cultures following cryogenic storage. *Mycologia* 68: 377-387.
- Jodon, M.H., D.J. Royse y S.C. Jong., 1982. Productivity of *Agaricus brunnescens* stock cultures following 5, 7 and 10 year storage periods in liquid nitrogen. *Criobiology* 19: 602-606.
- Jong, S.C., 1978. Conservation of the cultures. In: Chang, S.T. y W.A. Hayes (eds.), *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic Press, New York.
- Jong, S.C. y J.M. Birmingham., 1992. Current status of fungal culture collections and their role in biotechnology. In: Arora, D.K., R.P. Elander y K.G. Mukerji (eds.), *Handbook of Applied Mycology Vol. 4: Fungal Biotechnology*. Marcel Dekker, New York.
- Lara-Herrera, I., G. Mata y R. Gaitán-Hernández, 1997. Evaluation of the viability of *Pleurotus* spp. strains after liquid nitrogen cryopreservation. *Revista de Microbiología*. Sao Paulo.(En prensa).
- Mata, G., D. Salmones, R. Pérez y G. Guzmán, 1994. Behavior of some strains of the genus *Pleurotus* after different procedures for freezing in liquid nitrogen. *Revista de Microbiología*, Sao Paulo 25: 192-200.
- Ortega, P. y G. Mata, 1994. Evaluación de la viabilidad de recuperación de dos especies del género *Lentinus* en nitrógeno líquido. **V Congreso Nacional de Micología**. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., 27-30 de noviembre, 1994. Memorias p. 108.
- San Antonio, J.P. y S.C. Hwang, 1982. Liquid nitrogen preservation of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. spawn stocks. *Mush. Jour.* 120: 410-419.
- Sharp, J.R., 1984. The preservation of genetically unstable microorganisms and the cryopreservation of fermentation seed cultures. *Advances in Biotechnological Processes* 3: 81-109.
- Smith, D., 1982. Liquid nitrogen storage of fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 79: 415-421.

Recibido: 12 de noviembre, 1997. Aceptado: 10 de febrero, 1998.

Solicitud de sobretiros: Dulce Salmones.