

Part I. Shiitake

Capítulo 2

Spawn (Blanco de Hongo o Semilla) y Cepas de Shiitake

PRESERVACIÓN DEL SPAWN DE SHIITAKE POR ALMACENAMIENTO CRIOGÉNICO

Gerardo Mata * y Dulce Salmones

Unidad de Micología, Instituto de Ecología, Apdo. Postal 63, Xalapa 91000, Ver., México

* (gerardo_mata2000@yahoo.fr)

Introducción

La preservación a largo plazo de las propiedades y características especiales de una cepa de hongo cultivada requiere de un mantenimiento continuo. El método común de subcultivo continuo¹ de cepas en medios artificiales (el método tradicional) proporciona una preservación efectiva de las cepas a corto plazo. Sin embargo, este sistema puede aumentar el riesgo de contaminación accidental y/o cambios en las características morfológicas y fisiológicas de los organismos (Jong y Davis, 1986). El subcultivo continuo consume mucho tiempo, es laborioso y no es práctico para las colecciones grandes de cepas de hongos.

Subcultivo continuo: Deben mantenerse una higiene y un control ambiental (almacenamiento oscuro a 4°C) estrictos para evitar la degeneración del micelio causada por factores tales como patógenos, mutaciones y actividades metabólicas.

Escoja el borde pequeño de una colonia y póngalo en el centro de una placa de petri o en el centro o en la parte más baja de un tubo de ensayo lleno de medio fresco. Al escoger la muestra, evite el micelio viejo (la parte central de la colonia inoculada primero), que ahora puede contener compuestos metabólicos que retarden el crecimiento de micelio nuevo. No deben usarse partes amarronadas. Estas muestras nuevas saludables y jóvenes del cultivo deben transferirse periódicamente a medio fresco. Los medios usuales son PDA (Papa Dextrosa Agar) e YMA (Levadura extracto de Malta Agar).

Cuando la colonia cubre el 70% de los medios en las placas de petri, guárdelas a 4-5°C en oscuridad. Pueden guardarse por 3-4 meses de esta manera antes de hacer el siguiente subcultivo.

Los tubos (de 18mm diámetro x 150-180mm de altura) deben tener el medio inclinado a menos de 30 grados. Cuando se cierran con un tapón de silicona, estos tubos pueden guardarse durante 5-12 meses a 8-15°C y 60% de humedad relativa. Cuando se sellan con un tapón de algodón pueden guardarse durante 3-6 meses.

¹ Subcultivo: el acto de producir otro cultivo de microorganismos derivado de un cultivo original

² Crioprotector: sirve para proteger contra los efectos deletéreos de temperaturas de congelamiento

Se han desarrollado diferentes métodos de preservación a largo plazo con el objetivo de mejorar y conservar la estabilidad genética de las cepas. Actualmente, se acepta el almacenamiento en nitrógeno líquido como la mejor técnica de preservación para el almacenamiento de micelio de hongos a largo plazo (Chvostová y col., 1995). Este proceso debe manejarse cuidadosamente para que el micelio sea congelado y recuperado con éxito. Para evitar la formación de cristal de hielo y el daño celular causado por el congelamiento en nitrógeno líquido (-196°C), se utilizan soluciones crioprotectoras² (crioprotectores).

Los estudios pioneros en esta área de conservación fúngica a temperaturas extremadamente bajas se hicieron antes de 1960 (Hwang, 1960). Desde entonces, se han evaluado muchos métodos y materiales diferentes en un esfuerzo para perfeccionar el proceso. La viabilidad de las muestras congeladas depende de las especies de hongos y de la cepa. Además, el eventual éxito o fracaso depende de la edad del micelio, las condiciones de crecimiento, el tipo de crioprotector que se usa y su velocidad de penetración en las células del hongo, y los métodos y velocidad de congelamiento y descongelamiento (Chvostová y col., 1995; Mata y col., 2000).

La criopreservación de cepas de hongos superiores generalmente se lleva a cabo cortando bloques de agar de cultivos en crecimiento y sumergiéndolos luego en un crioprotector. En esta solución, los bloques de agar se enfrían gradualmente desde la temperatura ambiente hasta -40°C a una velocidad de 1-10°C /min (Smith, 1993, 1998), y luego se colocan en nitrógeno líquido. Tanto el enfriamiento gradual de las muestras como el uso de soluciones crioprotectoras han sido considerados absolutamente necesarios para la recuperación adecuada del micelio (Roquebert y Bury, 1993; Chvostová y col., 1995). Sin embargo, se ha obtenido una buena recuperación de micelio con procedimientos que usan diferentes surtidos de spawn y técnicas diferentes.

Por ejemplo, el *Agaricus bisporus* (el hongo botón) producirá micelio a partir de spawn congelado preparado con semillas de gramíneas³, cuando se usa un procedimiento de pre-enfriado (Hwang y San Antonio, 1972, 1982; Kneebone y col., 1974; Jodon y col., 1982; Suman y Jandaik, 1991). También se ha recuperado micelio congelado de *Volvariella volvacea*, *Pleurotus* spp. y *Lentinula* spp. cuando los spawns se congelaron inmediatamente en soluciones crioprotectoras (Pérez y Salmones, 1997; Lara Herrera y col., 1998 a, b; Mata y col., 2000). Es muy interesante notar que en la mayoría de los últimos casos citados, la recuperación del micelio y el nuevo crecimiento se iniciaron desde la cicatriz de unión de la semilla (hila)⁴ o de las hendiduras en la superficie de las semillas de gramíneas. Estos resultados sugieren que las semillas podrían haber actuado como protectores miceliales. En particular, aunque se sabe que los contenidos celulares cristalizan con el congelamiento rápido, ni el congelamiento inmediato del spawn ni la ausencia de sustancias crioprotectoras parecieron haber sido letales en estos estudios. En apoyo de esta hipótesis, se recuperaron recientemente con éxito micelios de spawn rápidamente congelados en nitrógeno líquido, sin el uso de crioprotectores (Mata y Pérez Merlo, 2003). Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual las semillas de spawn protegen el micelio, la viabilidad de la muestra obtenida con este método es muy alta (72 -100%).

Este trabajo muestra los resultados del desarrollo de una metodología. Es un sistema de congelamiento simple y barato para conservar y recuperar cepas de hongos comestibles.

Preparación de Spawn y Congelamiento y Descongelamiento de Muestras

Las cepas de shiitake deben pre-cultivarse durante 7 días en placas de petri con un medio sólido de papa, dextrosa y agar (PDA). La Figura 1 muestra los aspectos más importantes del método de preservación de spawn por almacenamiento criogénico.

³ Gramíneas: de, relacionando a, o característico de pastos

⁴ Hila: sg. hilum. cicatriz u ombligo en una semilla (cicatriz en la cobertura de la semilla donde ésta estaba unida a la pared del ovario)

El spawn debe prepararse por el método convencional con semilla de sorgo (*Sorghum vulgare*) pre-tratadas, hidratadas a 65% y luego esterilizadas a 121°C durante 1 hora. Después de la esterilización, las semillas de sorgo deben ponerse en placas de petri estériles. Cada placa debe inocularse luego con un micelio pre-cultivado, más su disco de agar (± 0.5 cm de diámetro). Las placas inoculadas, selladas con película de plástico elástica, deben incubarse en oscuridad por 14 días (a 25°C), para permitir que el crecimiento micelial cubra los granos de sorgo completamente.

Recipientes de policarbonato especiales (NALGENE): Para el congelamiento en nitrógeno líquido, se deben usar unos estuches de policarbonato (para la disposición de los viales dentro del contenedor de nitrógeno líquido) y guantes (Fig. 2). La solución crioprotectora se prepara con glicerol (10% v/v) en agua destilada. Esta solución se pone en los viales y se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Después de enfriar, debe ponerse el spawn de las semillas de sorgo totalmente incubadas en los recipientes (25 semillas por vial) (Figs.3). Las muestras deben permanecer en contacto con la solución crioprotectora durante 1 hora, y luego los viales en sus contenedores de policarbonato pueden colocarse directamente en el nitrógeno líquido (Fig. 4).

Para la recuperación de cepas, deben retirarse los viales del nitrógeno líquido y descongelarse en agua destilada a 30°C por 10 min (Mata y col., 2000) (Fig. 5). Una vez descongelados, los recipientes se limpian por 1 min con una solución de alcohol (70% v/v).

Después de limpiar, se drena el crioprotector y las semillas se colocan en placas de petri con PDA para estimular la recuperación y el crecimiento del micelio. Es muy importante llevar a cabo esta parte del proceso en un ambiente estéril usando una cámara de flujo laminar.

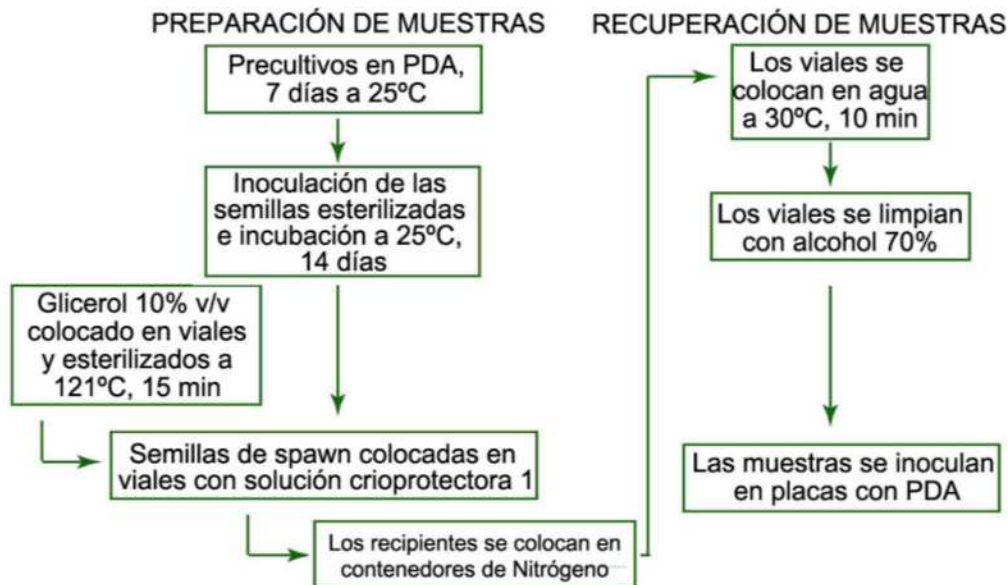


Figura 1. Aspectos importantes del método de almacenamiento criogénico para preservación de spawn



Figura 2. Material y herramientas usados para congelar spawn

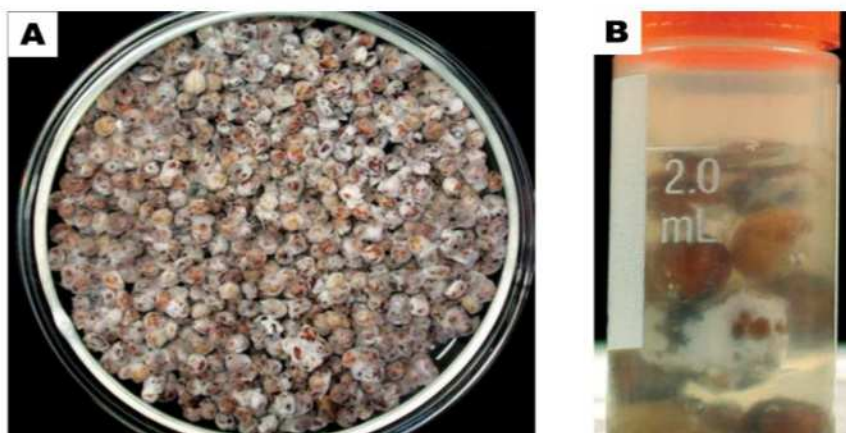


Figura 3. Spawn de semillas de sorgo totalmente colonizado en placas (A) y colocado en los viales con crioprotector (B)



Figura 4. Viales colocados en contenedores de policarbonato congelados en nitrógeno líquido

Crecimiento Micelial y Pruebas de Viabilidad

Cuando se usa este sistema, normalmente después de descongelar, todos los granos de sorgo habrán perdido las capas externas de micelio que los cubrían. Generalmente se recuperará el micelio de todas las muestras a partir del hilum o de las hendiduras en la superficie de las semillas (Mata y Pérez-Merlo, 2003) (Figs. 6). La velocidad de recuperación en las muestras de semilla varía según el tratamiento y la especie. Cepas de *Pleurotus djamor*, *P. pulmonarius*, *P. columbinus*, *V. volvacea*, *Lentinula edodes* y *L. borjana* mostraron un 100% de recuperación (Mata y Pérez-Merlo, 2003; Mata y col., 2004). Factores tales como la edad y el estado fisiológico de la hifa, así como sus contenidos citoplasmáticos, pueden haber afectado la capacidad de las células de los hongos de resistir el congelado y descongelado (Smith y Thomas, 1998). Ciertos estudios anteriores (Lara Herrera y col., 1998a; Mata y col., 2000) mostraron que el spawn tratado con una solución crioprotectora de glicerol, sin pre-congelado, producía un 100% de recuperación de cepas de *Pleurotus* y *Lentinula*. Además, no se observaron diferencias en la producción de hongos. La viabilidad del spawn de las cepas de *Pleurotus* spp. no fue afectada por el nitrógeno líquido durante 8 años. No se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento micelial, ni en la morfología o tamaño de los hongos (Mata y col., 2004).

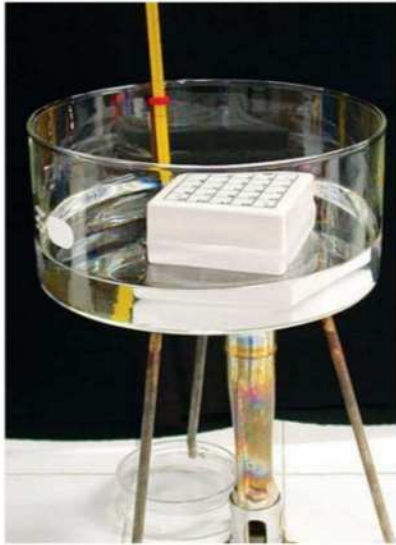


Figura 5. Descongelado de los viales para la recuperación de cepas

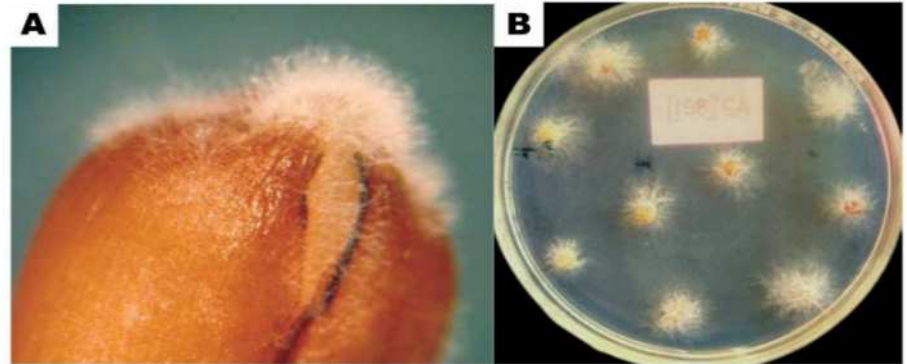


Figura 6. Micelio recuperado del hilum de la semilla (A) y muestras recuperadas completamente después de la criopreservación (B)

REFERENCIAS

- Chvostová, V., F. Nerud, and L. Homolka. 1995. Viability of wood-inhabiting basidiomycetes following cryogenic preservation. *Folia Microbiologica* 40:193-197.
- Hwang, S.W. 1960. Effects of ultra low temperatures on the viability of selected fungus strains. *Mycologia* 52: 527-529.
- Hwang, S.W., and J.P. San Antonio. 1972. Stability of spawn stocks of the cultivated mushroom after 26 months liquid nitrogen refrigeration (-160 to -196). *Mushroom Science* 8: 35-42.
- Jodon, M.H., D.J. Royse, and S.C. Jong. 1982. Productivity of *Agaricus brunnescens* stock cultures following 5-, 7-, and 10-year storage periods in liquid nitrogen. *Cryobiology* 19: 602-606.
- Jong, S.C, and E.E. Davis. 1986. Germoplasm preservation of edible fungi in culture through cryogenic storage. In: West, P.J., Royse, D.J., and R.B. Beelman, eds: *Cultivating Edible Fungi*. New York. Elsevier. pp. 213-225.
- Kneebone, L.R., S.W. Hwang, P.G. Shultz, and T.G. Patton Jr. 1974. Comparative production performance of stock cultures of eight strains of *Agaricus bisporus* preserved by liquid nitrogen freezing and by repeated vegetative transfer. *Mushroom Science* 9: 229-235.
- Lara-Herrera, I., G. Mata, and R. Gaitán-Hernández. 1998a. Evaluation of the viability of *Pleurotus* spp. strains after liquid nitrogen cryopreservation. *Revista de Microbiología* 29: 192-195.
- Lara-Herrera, I., G. Mata, and R. Gaitán-Hernández. 1998b. Evaluación del efecto de la criopreservación de cepas de *Pleurotus* sp. sobre la producción de carpóforos. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 44-47.
- Mata, G., and R. Pérez-Merlo. 2003. Spawn viability in edible mushrooms alter freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. *Cryobiology* 47: 14-20.
- Mata, G., D. Salmones, and P.M. Ortega. 2000. Viability and mushroom production of *Lentinula edodes* and *L. boryana* strains (Fungi: Basidiomycetes) after cryogenic storage of spawn stocks. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16:283-287.
- Mata, G., D. Salmones, and R. Gaitán. 2004. Spawn viability and mushroom production in *Pleurotus* strains frozen for eight years in liquid nitrogen. In: Romaine, P., C.B. Keil, D.L. Rinker, and D.J. Royse, eds: *Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. PennState University, University Park. pp.185-191.

- Pérez, R., and D. Salmenes. 1997. Viabilidad de cepas de *Volvariella volvacea* conservadas en nitrógeno líquido. *Revista Mexicana de Micología* 13: 78-80.
- Roquebert, M.F., and E. Bury. 1993. Effect of freezing and thawing on cell membranes of *Lentinus edodes*, the shiitake mushroom. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 641-647.
- San Antonio, J.P., and S.W. Hwang. 1982. Liquid nitrogen preservation of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. spawn stocks. *Mushroom Journal* 120: 410-419.
- Smith, D. 1993. Culture collection. In: Chang S.T., J.A. Buswell, and P.G. Miles, eds: *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms*. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers. pp. 15-33.
- Smith, D. 1998. The use of cryopreservation in the *ex-situ* conservation of Fungi. *Cryo-Letters* 19: 79-90.
- Smith, D., and V.E. Thomas, 1998. Cryogenic light microscopy and the development of cooling protocols for the cryopreservation of filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 49-57.
- Suman, B.C., and C.L. Jandaik. 1991. Preservation of culture of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. in liquid nitrogen and its effect on yield and characters of fruiting bodies. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 21: 34-37.