

Evaluación del efecto de la criopreservación de cepas de *Pleurotus* spp. sobre la producción de carpóforos

I. Lara-Herrera, Gastón Mata y Rigoberto Gaitán-Hernández

Instituto de Ecología, Apartado Postal 63, Xalapa 91000, Veracruz, México.

Resumen

Se evaluó el efecto de la conservación en nitrógeno líquido, en la producción de carpóforos de seis cepas de hongos del género *Pleurotus*, almacenadas durante 15 días a -196 °C. Los parámetros de evaluación fueron, tiempo en días de aparición de los primordios, número de cosechas, eficiencia biológica y tamaño de las fructificaciones. Las cepas fueron previamente evaluadas antes de su congelación. Se presentó variabilidad en el número de cosechas obtenidas (3-4), tamaño de las fructificaciones (< 5 cm a > 15 cm de diámetro del pileo) y eficiencias biológicas de las cepas en general, (55-105,6 %). Las fructificaciones obtenidas de las cepas criopreservadas no presentaron diferencias morfológicas respecto a las cepas testigo.

Palabras clave

Criopreservación, Producción de carpóforos, *Pleurotus*

Evaluation of the effect of cryopreservation of *Pleurotus* spp. strains on carpophore production

Summary

The effect of the cryopreservation of six *Pleurotus* strains was evaluated. Primordia initiation, number of flushes, biological efficiency and fruiting body size obtained with respect to pileus diameter was recorded. These strains were previously evaluated before storage in liquid nitrogen. Variation in the number of flushes (3-4), the fruiting body size (< 5 cm at > 15 cm) and biological efficiency was observed. This varied according to the strain used, ranging from 55-105.6%. The fruiting bodies of the cryopreserved strains did not differ with respect to the untreated strains.

Key words

Cryopreservation, Carpophore production, *Pleurotus*

Las cepas de hongos que se encuentran depositadas en las colecciones, representan un invaluable patrimonio para las investigaciones micológicas y desde luego para la industria alimenticia [1], por lo que el objetivo primordial de las colecciones de hongos es el de tratar de mantener sus características originales por períodos de tiempo lo más largo posible [2,3].

Para la conservación de las cepas se han estudiado y desarrollado diversos métodos de preservación entre los que se encuentran la resiembra periódica de los cultivos, la conservación en suelo o en agua destilada, la liofilización y el almacenamiento a temperaturas ultrabajas [4-9].

El almacenamiento en nitrógeno líquido ha sido la alternativa más recomendable para las cepas de algunos hongos cuyos micelios son delicados y frágiles [10]. Sin embargo, la evaluación de la productividad de cuerpos fructíferos de cepas criopre-

servadas ha sido poco estudiado [11-13], por lo que en el presente trabajo se realizó una evaluación comparativa de características de producción a nivel planta piloto de seis cepas del género *Pleurotus* antes y después de ser sometidas al nitrógeno líquido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron seis cepas que pertenecen a especies del género *Pleurotus*, las cuales están registradas y depositadas en el Cepario de Hongos del Instituto de Ecología de Xalapa, Veracruz, México, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Origen de las cepas estudiadas.

Especie	Cepa *	Procedencia
<i>Pleurotus djamor</i> (Fr.) Boedijn var. <i>djamor</i>	IE-111	México
<i>P. djamor</i> var. <i>djamor</i>	IE-116	México
<i>P. ostreatus</i> var. <i>columbinus</i> (Qué.) Qué.	IE-9 (Lc-1)	Guatemala
<i>P. ostreatus</i> var. <i>columbinus</i>	IE-140 (C-330)	EEUU
<i>P. ostreatus</i> (Jacq. :Fr.) Kumm. var. <i>ostreatus</i>	IE-129 (IFO-30160)	Japón
<i>P. pulmonarius</i> (Qué.) Sing.	IE-4 (INIREB-4)	Alemania

* El registro original se observa entre paréntesis.

Dirección para correspondencia:

Dr. Rigoberto Gaitán-Hernández
Instituto de Ecología, Apartado Postal 63, Xalapa
91000, Veracruz, México
Fax: 28 187809 E-mail: hongos@ecología.edu.mx

Aceptado para publicación el 8 de mayo de 1997

En el laboratorio, las cepas se hicieron crecer en placas de Petri con granos de sorgo estéril (*Sorghum vulgare* Pers.), estos granos con micelio de cada una de las cepas se colocaron en frasquitos de polipropileno con 1,2 ml de solución de glicerol al 10% v/v, siguiendo las técnicas de Hwang [8] y Suman y Jandaik [14], cada grano de sorgo colocado en los frasquitos, se consideró una muestra. En esta fase, se evaluó el tiempo de contacto del glicerol con el micelio, antes de la inmersión en nitrógeno líquido (-196 °C) (1, 2 y 3 h), tiempo de descongelación (5, 10 y 15 min) y temperatura de descongelación (30, 45 y 60°C). Las muestras se mantuvieron sumergidas en nitrógeno durante 15 días, para su recuperación, éstas se inocularon en placas de Petri con agar y extracto de malta e incubaron a 27,5°C en oscuridad. De acuerdo a lo anterior, se determinó que la mejor condición de recuperación para todas las cepas fue de 3 h de tiempo de contacto y 15 min de tiempo de descongelación a 30°C, con 100 % de recuperación de las muestras; se consideró muestra recuperada aquella en la que hubo crecimiento micelial en medio de cultivo, después de haber sido congelada [15]. Las cepas recuperadas en esta condición, fueron las que posteriormente se evaluaron a nivel planta piloto.

Para la evaluación en planta piloto se siguieron las técnicas descritas por Guzmán *et al.* [16]. El inóculo se preparó utilizando granos de sorgo previamente hidratados, se esterilizaron a 15 lb durante 45 min y en condiciones asépticas se inocularon con cada una de las cepas, e incubaron a 27,5°C en oscuridad. El substrato empleado fue paja de cebada, la cual se cortó en fragmentos de aproximadamente 5 cm por medio de una trilladora eléctrica. Se realizaron 14 réplicas de 500 g de substrato en peso seco por cepa y una humedad del 75% . Las muestras se pasteurizaron en pequeños sacos de polietileno permeables durante 45 min a 85°C. Una vez enfriado el substrato, se colocó en bolsas de plástico de 40 x 60 cm y se sembró con 100 g de inóculo de cada una de las cepas; las muestras se etiquetaron y se incubaron a 27,5°C en oscuridad. Cuando el micelio cubrió completamente el substrato se retiró la bolsa de plástico de cada una de las muestras y para favorecer la fructificación, éstas se pasaron a un área de iluminación natural indirecta, ventilación, temperatura, en donde el intervalo máximo osciló entre 26-31°C y el mínimo entre 15-22°C y una humedad relativa de 80-90% .

En la evaluación de la producción se consideraron diferentes variables respuesta como son: la eficiencia biológica (EB), la cual se expresó como el peso fresco de los hongos entre el peso seco del substrato por cien [17]; el tiempo en días hasta la aparición de los primordios a partir de la fecha de siembra, el número de cosechas obtenidas y el tamaño de las fructificaciones, éstas se agruparon por tamaños de acuerdo al diámetro del píleo: grupo 1 (G1), < 5 cm; grupo 2 (G2), de 5-9.9cm; grupo 3 (G3), de 10-14.9 cm y grupo 4 (G4), > 15 cm; según el método de Mata [18].

A los datos de producción obtenidos, se les aplicó un análisis de varianza bifactorial, además de una comparación de medias por medio de la prueba de rango múltiple de Tukey (95 %).

RESULTADOS

Se describen comparativamente los resultados de producción de las cepas testigo (T) y de las sometidas al nitrógeno (SN).

Cepa IE-111 (*Pleurotus djamor* var. *djamor*). El peso total de las fructificaciones cosechadas fluctuó entre 283,5-443,3 g en la cepa T y de 273,5-386 g en la SN (peso total obtenido de la muestra de menor y mayor producción), con una EB de 68,9% y 66,5% respectivamente. En ambas cepas se presentaron tres cosechas siendo la primera la mas abundante con mas del 50 % del peso total, así también desarrollaron fructificaciones de los tres primeros grupos establecidos siendo el G1 el mejor representado con mas del 45% del peso total de las mismas (tablas 2-4).

Tabla 2. Producción de las cepas (g) y comparación de su eficiencia biológica.

Cepa	t*	Total	σ	Eficiencia biológica (%)	
111T	10	344,7	55,2	b	68,9
111SN	13	332,4	36,7	b	66,5
116T	10	398,7	107,8	c	79,7
116SN	10	290,0	45,4	a	58,0
9T	43	277	57,27	a	55,5
9SN	65	293,3	54,3	a	58,7
140T	29	365,5	78,8	b	73,1
140SN	28	287,2	86,3	a	57,4
129T	40	274,8	80,1	a	55,0
129SN	77	298,7	55,7	a	59,7
4T	34	528,1	97,2	d	105,6
4SN	28	512,1	83,9	d	102,4

* Tiempo en días de aparición de los primordios a partir de la fecha de siembra. Letras diferentes en los valores de producción, indican diferencias significativas, al 95 % de confianza de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey.

Tabla 3. Producción promedio de las cepas evaluadas (g) por cosecha

Cepa	COSECHAS			
	1a	2a	3a	4a
111T	175,1 (50,8)q	89,4 (25,9) m	80,2 (23,3)l	---
111SN	199,3 (59,9)r	87,1 (26,2) m	46,0 (13,8)g	---
116T	277,4 (69,6)w	39,7 (9,9) f	81,6 (20,5)l	---
116SN	163,0 (56,2)p	92,5 (31,9) n	34,5 (11,9)e	---
9T	258,8 (93,2)v	18,9 (6,8) c	8,2 (2,8) b	---
9SN	210,2 (71,7)s	79,4 (25,5) k	---	---
140T	220,4 (60,3)t	89,6 (24,5) m	50,5 (13,8)h	5,0 (1,4)a
140SN	198,5 (69,1)r	58,8 (20,5) j	29,9 (10,4)d	---
129T	237,6 (86,5)u	37,2 (13,5) f	---	---
129SN	173,3 (58,0)q	92,3 (30,9) n	33,1 (11,1)e	---
4T	314,5 (59,5)x	155,7 (29,5)o	49,5 (9,4) g	8,4 (1,6)b
4SN	320,8 (62,6)y	135,9 (26,5)ñ	55,4 (10,8)j	---

Los números entre paréntesis indican el porcentaje obtenido de cuerpos fructíferos por cosecha, con base en la producción total por cepa. Letras diferentes en los valores de producción de las cosechas indican diferencias significativas, al 95 % de confianza de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey.

Cepa IE-116 (*P. djamor* var. *djamor*). El peso de las fructificaciones fluctuó de 230-593.8 g en la cepa T y de 222,8-383,3 g en la SN, presentando una EB de 79,7% y 58%, respectivamente. Se obtuvieron tres cosechas en ambas cepas, siendo la primera la más abundante con mas del 55% de la producción total. El grupo de hongos mejor representado fue el G1 con mas del 65% del total producido (tablas 2-4).

Cepa IE-9 (*Pleurotus ostreatus* var. *columbini*). El peso total de las fructificaciones fluctuó entre 182,5-356,6 g en la cepa T con una EB de 55,5% y de

215,1-402,7 g y una EB de 58,5% en la SN. De las dos cosechas que presentó la cepa T la primera fue la mayor con mas del 90% del total, mientras que de las tres cosechas que obtuvo la SN, también la primera fue la mas

Tabla 4. Producción promedio de cuerpos fructíferos (g) por grupos de tamaño

Cepa	G 1 *	G 2	G 3	G 4
111T	206,5 (5,9)w	109,9 (31,9)ñ	28,3 (8,2) d	
111SN	158,2 (47,6)u	149,0 (44,8)t	25,2 (7,6) d	
116T	276,7 (69,4)y	115,4 (28,9)o	6,5 (1,6) a	
116SN	217,0 (74,8)x	73,0 (25,2) j		
9T		42,3 (15,3) g	199,0 (71,8)v	35,7 (12,9) f
9SN	23,5 (8,0) d	84,5 (28,8) k	116,2 (39,6)p	69,2 (23,6) i
140T	162,3 (44,3)u	148,5 (40,6)t	50,0 (13,7) h	5,1 (1,4) a
140SN	130,1 (45,2)r	149,8 (52,0)t	8,0 (2,8) a	
129T	100,8 (36,7)n	134,5 (49,0)r	32,2 (11,7) d	7,2 (2,6) a
129SN	126,4 (42,0)q	149,2 (49,6)t	25,3 (8,4) d	
4T	156,2 (29,4)u	266,6 (50,1)y	94,2 (17,7) m	14,9 (2,8) b
4SN	142,5 (27,8)s	260,6 (50,9)y	88,1 (17,2) l	21,0 (4,1) c

* Grupos de tamaño según el diámetro del píleo, G1: < 5,0 cm, G2: de 5,0-9,9 cm, G3: de 10-14,9 y G4: > 15 cm. Los números entre paréntesis indican el porcentaje obtenido de cuerpos fructíferos por grupo de tamaño, con base en la producción total por cepa. Las diferentes letras frente a cada valor, indican diferencias significativas al 95 % de confianza con la prueba de rango múltiple de Tukey.

abundante con mas del 70% de la producción total. La cepa T desarrolló fructificaciones de los tres primeros grupos de tamaño siendo el G2 el más representativo, mientras que la cepa SN presentó hongos de los cuatro grupos, con el G3 como mayoritario (tablas 2-4).

Cepa IE-140 (*P. ostreatus* var. *columbinus*). La producción total de hongos fue de 255-492,7 g en la cepa T y de 151-423,2 g en la SN con una EB de 73,1% y de 57,4% respectivamente. La cepa T presentó cuatro cosechas y la SN tres, en ambas la primera fue la mejor representada con mas del 60% del total producido. La cepa T produjo cuatro grupos de tamaño y la SN tres, en las dos cepas el G2 fue el mayoritario con mas del 40% del total en la T y mas del 50% en la SN (tablas 2-4).

Cepa IE-129 (*P. ostreatus* var. *ostreatus*). En la cepa T el peso total de los hongos fue de 160,4-471,1 g con una EB de 55%, obtenida en dos cosechas y una producción de cerca del 90% del total de hongos en la primera de ellas. Se presentaron todos los grupos de tamaño, el G2 fue el más representativo con cerca del 50% de las fructificaciones. Por otra parte en la cepa SN la producción osciló entre 247,3-398,3 g, alcanzando una EB de 59,7%, en tres cosechas. La primera cosecha fue la mejor con cerca del 60% del total de fructificaciones. El grupo de hongos mejor representado fue el G2 con más del 45% (tablas 2-4).

Cepa IE-4 (*Pleurotus pulmonarius*). En la cepa T la producción fluctuó entre 416,2-723,9 g con EB de 105,6% en cuatro cosechas, la primera fue la más representativa con cerca del 60%. La cepa desarrolló fructificaciones de todos los grupos de tamaño, el G2 fue el mejor con más del 50% del total de hongos producidos. En tanto que la cepa SN alcanzó una EB del 102,4% en tres cosechas con más del 60% de la producción en la primera de ellas. Se produjeron hongos de todos los grupos con una producción superior al 50% del G2 (tablas 2-4).

De acuerdo al análisis de varianza para un diseño bifactorial, realizado a los datos de producción obtenidos, presentaron diferencias significativas (< 0,05) las cepas, así como las cosechas, asimismo los grupos de tamaño de hongos. Los resultados de la prueba de rango múltiple de

Tukey se observan en las tablas 2 a 4.

Las fructificaciones de las cepas evaluadas después de ser sometidas al almacenamiento en nitrógeno líquido, no mostraron diferencias morfológicas, respecto a las cepas testigo.

DISCUSIÓN

En las cepas de *P. djamor* var. *djamor*, la eficiencia biológica después de la congelación decreció en ambas cepas. Sin embargo, estadísticamente, la IE-111 no presentó diferencia significativa y a pesar de que la IE-116 si la mostró (tabla 2), ésta concuerda con las EBs citadas por Guzmán *et al.* [19], para esta especie (38,5-82,4%), lo mismo que el tiempo de aparición de primordios (11-19 días). Con respecto a las cepas de *P. ostreatus* var. *columbinus*, la cepa IE-9 no presentó diferencia significativa entre la EBs de la cepa T y la SN, sin embargo, se observaron diferencias evidentes en los días de aparición de primordios, así también en la cepa IE-129 de *P. ostreatus* var. *ostreatus*, periodo que coincide con el promedio citado para estas cepas en trabajos previos [20,21]. Por su parte, la cepa IE-140 presentó diferencia significativa dada la variación en el número de cosechas obtenidas, así como en la producción de hongos por grupos de tamaño (tablas 2-4). En el caso de *P. pulmonarius*, la cepa SN no presentó diferencia significativa en cuanto a la EB (tabla 2). El número de cosechas obtenidas fue semejante al citado por Guzmán-Dávalos *et al.* [22,23] en bagazo de maguey y bagazo de caña respectivamente para esta misma cepa. No obstante, las EBs registradas en el presente trabajo fueron superiores.

En el resultados obtenidos se observó que con excepción de las cepas de *P. djamor* var. *djamor*, las cepas restantes presentaron variabilidad en el número de cosechas alcanzadas antes y después de su conservación en nitrógeno líquido. Sin embargo, cabe destacar que las diferencias presentadas en cuanto a la productividad de las diferentes cepas después de ser almacenadas en el nitrógeno, también fueron registradas en cepas de *Agaricus* por varios autores [11,14,24]. Sin embargo se necesitan estudios más extensos y profundos a nivel estructural para determinar si estas diferencias fueron causadas directamente o no por la congelación, ya que éstas también se han reportado cuando se analiza la productividad de cepas, las cuales son conservadas mediante resiembras periódicas en agar [25].

Por último, cabe mencionar que, dado que las fructificaciones obtenidas de las cepas criopreservadas no presentaron diferencias morfológicas respecto a las cepas testigo y que las variaciones observadas en datos de productividad, fueron debidas principalmente a los factores medioambientales que prevalecieron durante la producción, se puede concluir que, el método de almacenamiento en nitrógeno líquido es recomendable para la conservación de cepas del género *Pleurotus* aquí estudiadas.

Los autores agradecen al Dr. Gastón Guzmán y a la Master en Ciencias Dulce Salmones por sus sugerencias durante el desarrollo del presente estudio. A la Bióloga Verónica Álvarez por su apoyo en los trabajos de planta piloto. Este trabajo fue gracias al financiamiento del CONACYT (1810-N9211)

Bibliografía

1. Sharp JR. The preservation of genetically unstable microorganisms and the cryopreservation of fermentation seed cultures. *Adv Biotechnol Process* 1984;3:81-109.
2. Fennell DI. Conservation of fungous cultures. *Botanic Rev* 1960;26:79-141.
3. Smith D, Onions AHS. The preservation and maintenance of living fungi. Kew, CAB Mycological Institute, 1984.
4. Challen MP, Elliott TJ. Polypropylene straw ampoules for the storage of microorganisms in liquid nitrogen. *J Microbiol Methods* 1986;5:11-23.
5. Chang ST, Miles PG. Edible mushroom and their cultivation. Boca Raton, CRC Press, 1989.
6. Elliott TJ, Challen MP. The storage of mushroom strains in liquid nitrogen. *The Glasshouse Crops Res Inst Ann Rep* 1979; 194-204.
7. Heckly RJ. Preservation of microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 1978;24:1-53.
8. Hwang SW. Effects of ultra-low temperature on the viability of selected fungus strain. *Mycologia* 1960;52:227-229.
9. Jong SC. Conservation of the cultures. En: Chang ST, Hayes WA (Eds.) *The biology and cultivation of edible mushrooms*. New York, Academic Press, 1978:119-133.
10. Smith D. Culture collections. En: Chang ST, Buswell JA, Miles PG (Eds.) *Genetics and breeding of edible mushroom*. Amsterdam, OPA, 1993.
11. Jodon MH, Royse DJ, Jong SC. Productivity of *Agaricus brunnescens* stock cultures following 5-, 7-, and 10-year storage periods in liquid nitrogen. *Criobiology* 1982;19:602-606.
12. Maekawa N, Fukuda M, Arita T, Komatsu M. Effects of liquid-nitrogen cryopreservation on stock cultures of three cultivated basidiomycetous fungi. *Rept Tottori Mycol Inst* 1990; 28:227-232.
13. San Antonio JP. Stability of spawn stocks of the cultivated mushroom stored for nine year in liquid nitrogen (-160 to -196 °C) *Mush Sci* 1978;10:103-113.
14. Suman BC, Jandaik GL. Preservation of cultures *Agaricus bisporus* (Lange)Sing. in liquid nitrogen and its effect on yield and characters of fruiting bodies. *Indian J Mycol PI Pathol* 1991;21:34-37.
15. Lara-Herrera I, Mata G. Estudio sobre la conservación y viabilidad de cepas del género *Pleurotus* en nitrógeno líquido. Guanajuato, V Congreso Nacional de Micología (memorias), 1994.
16. Guzmán G, Mata G, Salmones D, Soto-Velazco C, Guzmán-Dávalos L. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. México DF, Instituto Politécnico Nacional, 1993.
17. Stamets P. *Growing gourmet and medicinal mushroom*. Olympia. 1993.
18. Mata G. Cultivo masivo de *Lentinus edodes* en troncos de encino en México. Tlaxcala, IV Congreso Nacional de Micología (memorias), 1991.
19. Guzmán G, Montoya L, Salmones D, Bandala VM. Studies on the genus *Pleurotus* (Basidiomycotina), II. *P. djamor* in Mexico and in other Latin-American countries, taxonomic confusions, distribution and semi-industrial culture. *Crypt Bot* 1993;3:213-220.
20. Mata G, Gaitán-Hernández R. Cultivo de *Pleurotus* en hojas de caña de azúcar. *Rev Mex Mic* 1995;11:17-22.
21. Salmones D, Mata G, Guzmán G, Juárez M, Montoya L. Estudios sobre el género *Pleurotus*, V. Producción a nivel planta piloto de ocho cepas adscritas a cinco taxa. *Rev Iberoam Micol* 1995;12:108-110.
22. Guzmán-Dávalos L, Martínez-Carrera D, Morales P, Soto C. El cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus*) sobre el bagazo del maguey en la industria tequilera. *Rev Mex Mic* 1987;3:47-49.
23. Guzmán-Dávalos L, Soto C, Martínez-Carrera D. El bagazo de la caña de azúcar como sustrato para la producción de *Pleurotus* en Jalisco. *Rev Mex Mic* 1987;3:79-82.
24. Hwang SW, San Antonio JP. Stability of spawn stock of the cultivated mushroom after 26 months liquid nitrogen refrigeration (-160°C to -196°C). *Mush Sci* 1972;8:35-42.
25. Maekawa N, Fukuda M, Arita T, Komatsu M. Cryopreservation of edible basidiomycetous fungi in liquid nitrogen. *Rept Tottori Mycol Inst* 1988;26:15-28.