



8

El Cepario de Hongos
del Instituto
de Ecología, A.C.

Autores

Dulce Salmones y Gerardo Mata

Instituto de Ecología, A. C. Red de Manejo Biotecnológico de Recursos, Instituto de Ecología, A. C.
Km 2.5 carretera antigua a Coatepec, C.P. 91000, Xalapa, Veracruz, México.

*Autor para correspondencia, e-mail: dulce.salmones@inecol.edu.mx

Resumen

Con casi 30 años de existencia, el Cepario de Hongos de Instituto de Ecología resguarda una colección muy importante de cepas. Dicho cepario está formado por tres secciones: 1) hongos saprobios microscópicos (250 cepas); 2) hongos fitoparásitos y de control biológico (150 cepas), y 3) macromicetos comestibles y medicinales (356 cepas). Las cepas se mantienen en medio de cultivo, en aceite mineral o congeladas en nitrógeno líquido, según el tipo de hongo que se trate. Buena parte de las cepas resguardadas son mexicanas y de origen silvestre, sin embargo, también se conservan cepas provenientes del extranjero, cepas comerciales (macromicetos) y otras han sido obtenidas por selección y entrecruzamiento genético. La colección de cepas de macromicetos resguarda especies de gran importancia comercial en México como el champiñón (*Agaricus bisporus*), las setas (*Pleurotus* spp.) y el shiitake (*Lentinula edodes*), además de otras especies con gran potencial para su cultivo comercial. El cepario está registrado en el Centro Mundial de Datos de Microorganismos y en la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Palabras clave

Ceparios, germoplasma, hongos comestibles, hongos fitopatógenos, hongos saprófitos.

Introducción

Las colecciones de cultivos están dedicadas a ofrecer servicios y respaldar el trabajo científico y tecnológico de los laboratorios a través de la colecta, mantenimiento y preservación del germoplasma. Los ceparios de hongos juegan un papel muy importante en la preservación y mantenimiento de uno de los grupos más abundantes de organismos existentes en el planeta, considerando que estos podrían alcanzar un millón y medio de especies (17). De acuerdo a los datos registrados por el Centro Mundial de Datos de Microorganismos (WDCC, por sus siglas en Inglés), sus agremiados resguardan 1,746,630 cultivos en 589 colecciones provenientes de 68 países, de los cuales 506,396 (28.9%) corresponden a ceparios de hongos (marzo 11, 2011) (68). México solo ha aportado 2,681 cultivos a estas es-

tadísticas, lo que representa un valor muy bajo si consideramos que Guzmán (11) citó que en nuestro país podrían existir cerca de 200,000 especies de hongos. Estas estimaciones realizadas con base, entre otros factores, a la privilegiada ubicación geográfica de nuestro país que le permite contar con la mayoría de los tipos de vegetación y paisajes naturales posibles de encontrar en el planeta. Lamentablemente, la pérdida de hábitats naturales pone en peligro la supervivencia de muchas especies de hongos, por lo que las colecciones de cultivos adquieren cada vez mayor importancia en la conservación *ex situ* de la biodiversidad y representan un importante componente en el desarrollo de investigaciones científicas y tecnológicas.

Debido a lo anterior, en los Centros de In-

vestigación Conacyt, entre los que se encuentra el Instituto de Ecología, A.C. (Inecol), la formación y mantenimiento de colecciones de cultivos ha sido un

esfuerzo permanente de diferentes grupos académicos, que tienen la tarea de resguardar organismos tan diversos como plantas, hongos, algas y bacterias (65).

Fundación de la colección

El Cepario de Hongos del Inecol se formó en 1982, bajo la administración del extinto Instituto Nacional de Investigaciones Bióticas (Inireb), centro de investigaciones que terminó sus actividades en diciembre de 1988, por lo que a partir de 1989 la colección pasó a resguardo del Instituto de Ecología, A.C. En los últimos 20 años, la colección se ha enriquecido con cepas de diversas especies de hongos, principalmente silvestres y/u obtenidas por entrecruzamiento genético en el laboratorio, con énfasis en germoplasma con potencial aprovechamiento nutrimental y medicinal. Inicialmente este cepario solo resguardaba especies de hongos comestibles, pero recientemente se ha incorporado germoplasma de hongos saprobios,

fitoparásitos y de control biológico, diversificando las áreas de apoyo que la colección presta a los estudios micológicos que se realizan en la institución.

A la fecha, la colección ha sido soporte de más de 20 proyectos financiados por ANUIES-CSUCA, ANUIES-ECO, Conabio, Conacyt, Semarnat y empresas particulares, entre otros. La colección tiene como acrónimo las siglas IE seguidas de una numeración progresiva de dígitos, y está conformada por más de 700 cepas aisladas principalmente de especímenes silvestres de México, aunque también se almacena germoplasma obtenido por intercambio y/o donación de otras instituciones nacionales e internacionales.

Estructura de la colección

Sección Hongos Saprobios Microscópicos

Esta sección fue fundada hace aproximadamente 15 años, como respaldo a los estudios taxonómicos y ecológicos de los hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. En particular, se cuenta con especies saprobias y simbiontes bajo la responsabilidad de la Dra. Gabriela Heredia, su fundadora.

A la fecha, la sección cuenta con aproximadamente 250 cepas aisladas del suelo y restos vegetales de diferentes localidades del centro de Veracruz,

específicamente de fincas cafetaleras y zonas con bosque mesófilo (Fig. 1). El germoplasma resguardado es utilizado en estudios ecológicos (competencia, colonización y depredación de especies de la hojarasca) y biotecnológicos (producción de enzimas y metabolitos secundarios de interés en la industria farmacéutica). Además, se investiga el impacto que tiene el manejo de los agroecosistemas cafetaleros en la diversidad de diferentes grupos de hongos microscópicos.



Figura 1. a) Colecta y b) aislamiento de hongos saprobios asociados a restos vegetales.

Los métodos de aislamiento de las cepas utilizados son por filtrado y lavado de partículas (hongos del suelo) y por recolecta directa mediante cámaras húmedas (hongos asociados a restos vegetales) (Fig. 2).

Los micelios se conservan en refrigeración (5 °C), en frascos pequeños conteniendo medio de cultivo y aceite mineral. A corto plazo se planea liofilizar toda la colección y conservarla en ultracongelación.



Figura 2. Conservación de las cepas.

La sección está constituida de hongos anamorfos (Hyphomycetes) y Ascomicetos, especies

celulolíticas (grupo *Chetomium*) y especies entomopatógenas y fitoparásitas (Fig. 3).

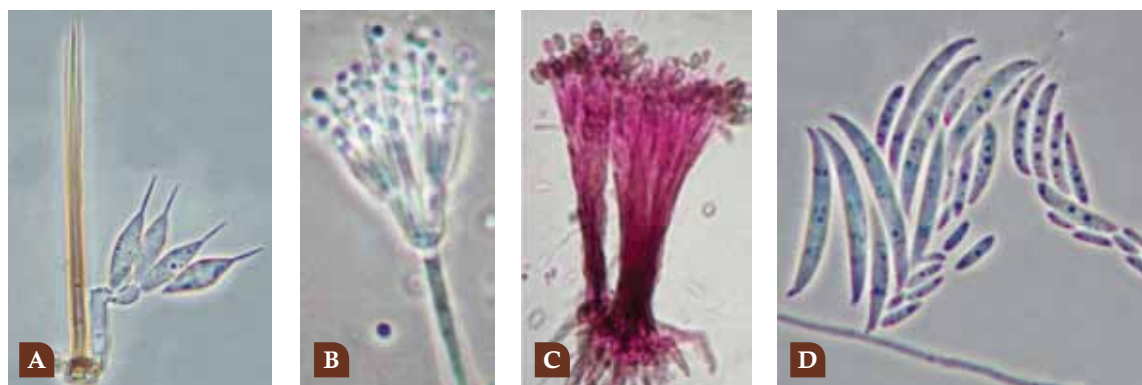


Figura 3. a) Conidióforo de *Beltrania rhombica*, hongo saprobio aislado de hojas; b) *Penicillium* sp.; c) *Graphium* sp., y d) *Cylindrocarpon* sp. aislados de suelo. (Fotos de Gabriela Heredia).

Sección Hongos Fitoparásitos y de Control Biológico

La colección tiene sus orígenes en 1990, como parte de los resultados de un proyecto interinstitucional sobre “Hongos patógenos de *Mimosa pigra* en México”, bajo la dirección de la Dra. Gloria Carrión, responsable de esta sección.

En años posteriores, diversos estudios realizados sobre sistemática e interacciones de los hongos con plantas, insectos y con otros hongos han repercutido en el incremento y diversidad de las especies conservadas. Actualmente, esta sección cuenta con 149 cepas liofilizadas, colectadas en zonas perturbadas y de cultivos en los estados

de Veracruz, Puebla y Tabasco, así como de la Reserva El Edén, Quintana Roo. Los grupos mejor representados son: micoparásitos (principalmente de *Hemileia vastratix* Berk. & Br.), entomopatógenos (mayoritariamente de la broca *Hypothenemus hampei* [Ferrari] y la hormiga [*Atta mexicana*]), endófitos del café, galería de broca del café, fitoparásitos, nematófagos y aislados de la filósfera. Los géneros con mayor representatividad en la colección son: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Calcarisporium*, *Fusarium*, *Entyloma*, *Metharhizium*, *Mucor* y *Paecilomyces* (Fig. 4)

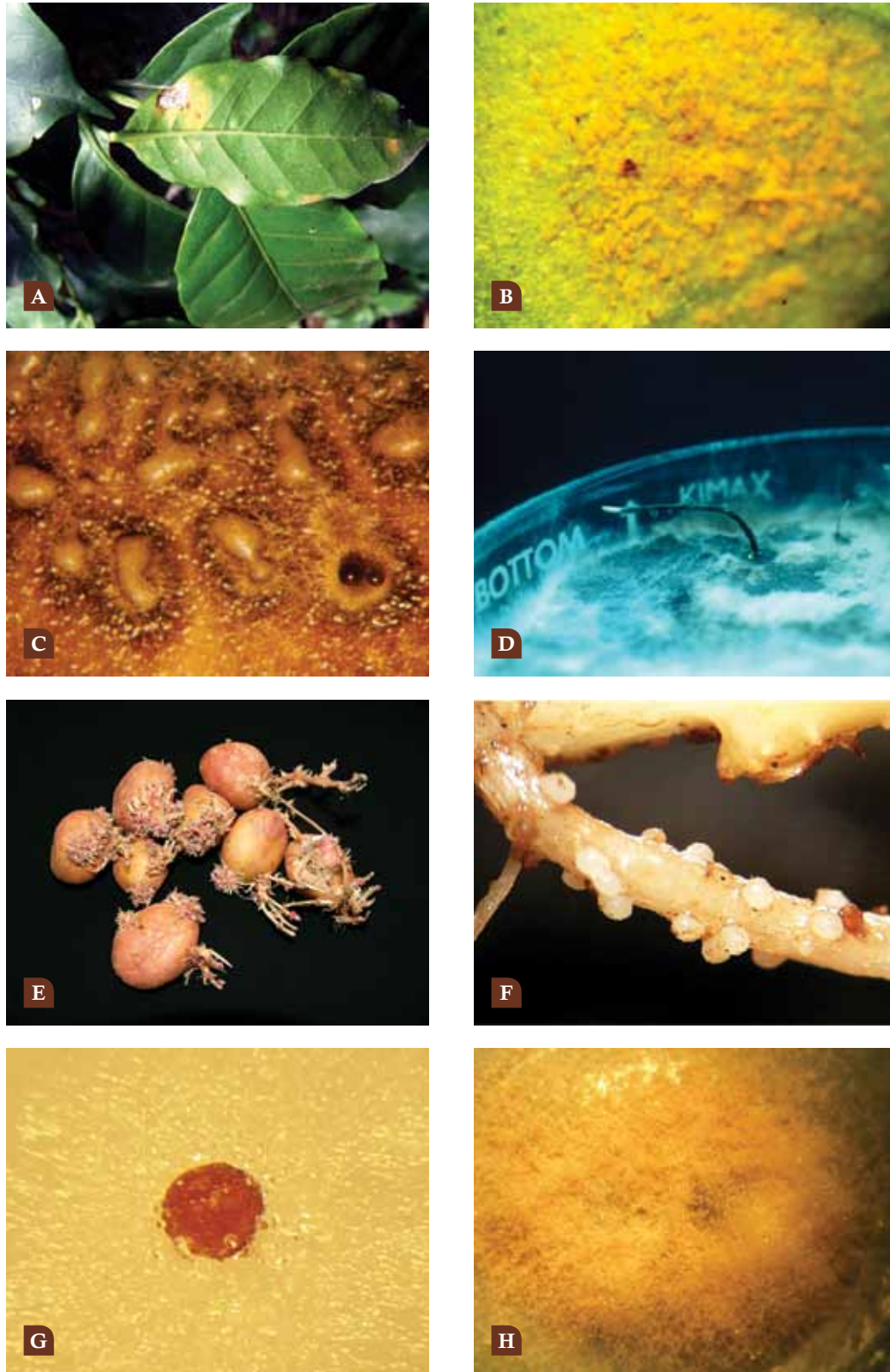


Figura 4. a) y b) Roya del café con micoparásito; c) endófitos del café, *Colletotricum* sp.; d) anamorfo de *Xylaria* sp.; e) raíces de papa parasitadas con *Fusarium ventricosum*; f) hembras fecundadas del nemátodo dorado de la papa *Globodera rostochiensis*; g) quistes de *G. rostochiensis*; h) *Paecilomyces lilacinus*.
(Fotos de Gloria Carrión).

Sección Macromicetos comestibles y medicinales

El origen de la sección de hongos comestibles se remonta al año de 1982, con el inicio de actividades del Proyecto Micología del extinto Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (Inireb), y como resultado de estudios pioneros de cultivo de hongos comestibles realizados en México. Durante los primeros siete años de existencia, la colección alcanzó a tener 52 cepas (31). A partir de 1989, el Cepario está bajo resguardo del Inecol y está registrado en el *World Data Centre for Microorganisms*

(WDCM 782) y en la Semarnat (VER-HON-194-05-07). Actualmente se conservan cepas adscritas a los géneros *Agaricus*, *Auricularia*, *Calvatia*, *Cookeina*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Hericium*, *Hypsizigus*, *Laetiporus*, *Lentinula*, *Lepista*, *Macrolepiota*, *Morchella*, *Neolentinus*, *Oudemansiella*, *Pholiota*, *Pleurotus* y *Volvariella* (Fig. 5). Por el número de cepas y especies comestibles representadas, esta sección es considerada una de las más importantes a nivel nacional y latinoamericano (39).

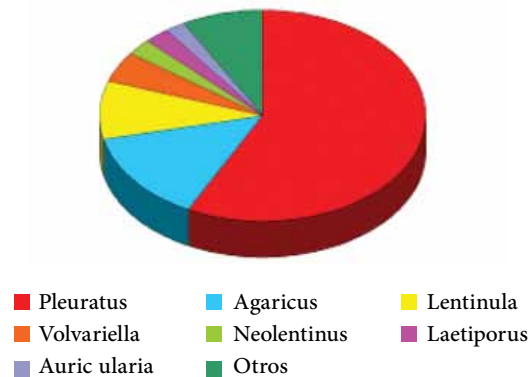


Figura 5. Composición de la sección de hongos comestibles del Cepario.

El 49% de la colección corresponde a cepas de interés comercial depositadas en la colección por investigadores de instituciones extranjeras dedicadas al cultivo de hongos comestibles y/o fueron resultado de trabajos interinstitucionales desarrollados con centros de enseñanza e investigación tan diversos como: Jardín Botánico Nacional de Cuba (La Habana, Cuba), Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar (La Habana, Cuba), Instituto de Ecología y Sistemática (La Habana, Cuba), *Institute Nationale de la Recherche Agronomique* (Bordeaux, Francia), Universidad Autónoma de Chiriqui (Panamá), entre otros.

En cuanto a las cepas silvestres mexicanas, que corresponden al 35.6% de la colección, la mayor parte de los especímenes fue colectada en la región central del Estado de Veracruz, encontrándose el material herborizado depositado en la Colección de Hongos del Herbario (XAL) de nuestra institución. Una tercera sección del Cepario, correspondiente al 15.4%, está constituida por germoplasma obtenido y seleccionado en nuestro laboratorio mediante técnicas de entrecruzamiento genético, a partir de cepas comerciales y/o silvestres. En este caso, réplicas de algunos especímenes cultivados se encuentran la Colección de Hongos de nuestra institución (Herbario XAL).

Importancia comercial de las especies comestibles en resguardo

Agaricus bisporus

Esta especie, conocida comercialmente como champiñón, ocupa el primer lugar de producción mundial, con una producción total estimada de tres

millones de toneladas anuales (52) (Fig. 6). Los principales países productores son: China que aporta cerca de 70% de la producción total de todos los hongos

cultivados, Estados Unidos, Holanda, España, Francia y Polonia (3, 4). El cultivo del champiñón en México inició en la década de 1930 (30) y desde entonces su

producción se ha incrementado gradualmente, siendo en la actualidad nuestro país el principal proveedor de champiñón en América Latina (29).



Figura 6. *Agaricus bisporus*. (Foto de Gerardo Mata y Rigoberto Gaitán Hernández).

Este hongo requiere de un sustrato parcialmente degradado y enriquecido con fuentes nitrogenadas. El sistema de producción mayoritariamente empleado es en bolsas plásticas, similar al sistema francés, aunque algunas empresas continúan utilizando camas, el cual se caracteriza por emplear contenedores de madera donde se coloca la composta, así también el sistema de bandejas metálicas. El proceso de producción se divide en las siguientes fases: fermentación (fase I o compostaje), fermentación controlada (fase II o

pasteurización), siembra e incubación, cobertura, inducción, producción y cosecha. El sustrato está compuesto básicamente de paja de distintos cereales (trigo, cebada, avena) (52).

Durante el siglo pasado se consideró que *A. bisporus* no crecía silvestre en México, pero estudios recientes han demostrado lo contrario (33), generándose una serie de investigaciones tendientes a mejorar el rendimiento de dichas cepas así como su resistencia a organismos antagónicos (26, 34).

Lentinula edodes

Esta especie es conocida comercialmente como “shiitake” en Japón, “xiang-gu” en China y “champignon parfumé” en Francia (37, 7). El shiitake es originario del este de Asia, donde se cultiva desde hace 900 años (28). Actualmente, el shiitake es la segunda especie más cultivada comercialmente en el mundo después del champiñón. El cultivo de esta especie se realiza a través de dos métodos que requieren infraestructura y metodologías distintas. El método tradicional se basa en la utilización de troncos, principalmente de encino (*Quercus* spp.) que son inoculados con micelio del hongo producido en semillas o aserrín (69). El

método moderno se basa en la preparación de un sustrato a base de aserrín u otros componentes que son esterilizados en autoclave o pasteurizados con vapor (5). El empleo de este último método, si bien se realiza en períodos cortos y con alta productividad, requiere de una selección cuidadosa de cepas y materiales a utilizar.

En México, el shiitake se ha cultivado experimentalmente en diversos sustratos a base de madera de especies de los géneros *Carpinus*, *Bursera*, *Alnus* y *Eliocarpus* (37, 49, 50), así como en pulpa de café y bagazo de caña de azúcar (47, 56).

Pleurotus

Los hongos conocidos popularmente en México como “orejas blancas”, “orejas de patacán” u “orejas de palo” fueron introducidos al mercado mexicano con el nombre comercial de “setas”, debido a que la tec-

nología inicial de su cultivo provenía de España, país en donde todas las especies comestibles son popularmente llamaas setas. En México, “setas” se refiere únicamente a las especies del género *Pleurotus* (Fig. 7).



Figura 7. *Pleurotus pulmonarius*.
(Fotos de Gerardo Mata y Rigoberto Gaitán Hernández).

En la década de los 80's se iniciaron los estudios y experiencias para el cultivo de *Pleurotus* en México (13). La instalación de la primera planta piloto sirvió como centro de aprendizaje para gran cantidad de pequeños productores nacionales y extranjeros, ya que el modelo de producción propuesto era fácilmente reproducible (16). Estas condiciones, tecnología simple y aprendizaje, favorecieron la aparición de una gran cantidad de pequeños productores que gradualmente impactaron sobre el mercado regional y, posteriormente, nacional. El notable incremento de esta industria se basó en la adaptación de la tecnología existente a las condiciones del país. A la fecha, existe una decena de grupos académicos dedicados al estudio del *Pleurotus* en México, cuyas investigaciones se centran en la selección de cepas de alta productividad, pruebas con sustratos potenciales, preparación de inóculo mejorado, tratamiento del sustrato y en general, en la optimización de los sistemas de cultivo.

La amplia disponibilidad de sustratos potenciales para el cultivo de *Pleurotus* ha impulsado la evaluación de aproximadamente 40 residuos lignocelulósicos tan diversos como son las pajas de cereales, los subproductos de la cosecha del café, de la caña de azúcar, del maguey tequilero, del maíz, del frijol, etc. Además, se han evaluado más de 80 formulaciones combinando dos o más sustratos (48). Entre los sustratos evaluados se distinguen los resultados con la pulpa de café, uno de los residuos agroindustriales más importantes del país y que debido a los altos rendimientos alcanzados, los estudios se han diversificado a otras especies comestibles.

Desde el punto de vista taxonómico, el género *Pleurotus* es complejo, por lo que se han realizado diversos estudios para determinar las

especies involucradas en este importante grupo de hongos (12). En México se cultivan principalmente *P. pulmonarius* y *P. ostreatus*, a partir de especímenes introducidos de otros países, ya que la disponibilidad de germoplasma silvestre nacional está en discusión, especialmente con la última especie (2).

Por otra parte, se tiene interés en introducir comercialmente a *P. djamor*, una especie nativa de amplia distribución que crece de manera natural en las regiones tropicales y subtropicales. *Pleurotus djamor* presenta dos variedades ecológicas, blanca y rosa, siendo sus ciclos de cultivo más cortos que los de las especies templadas. A la fecha se han hecho notables avances en el entrecruzamiento y selección de cepas de *Pleurotus* (14, 15, 55, 9, 58, 72), con la finalidad de incrementar la productividad, así como de desarrollar sus fructificaciones en sustratos disponibles no convencionales, como las hojas de caña de azúcar o la viruta de pino (48, 45).

Otras especies silvestres en México resguardadas en la colección y de las que existen registros del consumo tradicional en México son: los hongos conocidos como “yemitas”, “hongo del bagazo”, “hongo de la paja” u “hongo del plátano”, *Volvariella volvacea* y *V. bombycina*, que son especies tropicales ampliamente cultivadas en el sureste asiático (Fig. 8). En México se han realizado ensayos utilizando sustratos como bagazo de henequén, diferentes pajas, pulpa de café y pseudotallo de plátano, logrando obtener fructificaciones con una metodología básica. Sin embargo, no se ha logrado incentivar su producción comercial (71, 57, 23). Actualmente el producto importado de estas especies es destinado básicamente a los restaurantes de comida oriental (china y japonesa).



Figura 8. *Volvariella volvacea*.
(Foto de Gerardo Mata y Rigoberto Gaitán Hernández).

Auricularia incluye dos o tres especies comestibles conocidas popularmente como “orejas”, que crecen abundantemente en las regiones tropicales y subtropicales del país. Al igual que *V. volvacea*, las especies de *Auricularia* son importadas de Asia. En pruebas a nivel piloto, se han desarrollado fructificaciones en pulpa de café y viruta de *Inga jinicuil* (44).

Lentinula boryana crece silvestre en bosques caducifolios y de encino en regiones subtropicales de América (Fig. 9). Esta especie resulta particu-

larmente importante debido a su semejanza con el shiitake. Se ha demostrado que se trata de dos especies bien diferenciadas aunque cercanamente emparentadas (43), razón por la cual se le ha denominado como el “shiitake americano”. En los mercados populares de México se le conoce como “cuerudo” u “hongo de encino” y, aunque se encuentra frecuentemente en venta, no es de las especies más apreciadas. Su cultivo experimental se ha realizado en madera de *Quercus* y *Carpinus*, bagazos de maguey tequilero y caña de azúcar (41, 66, 62).



Figura 9. *Lentinula boryana*.
(Foto de Gerardo Mata y Rigoberto Gaitán Hernández).

Neolentinus suffrutescens es una especie común en zonas templadas con bosques o plantaciones de pinos; tiene una distribución mundial y es común en México creciendo sobre madera de pino, en troncos o tocones. Se le conoce con los nombres populares de “cuaresmeño”, “hongo de pino” u “hongo de ocote”. En algunas regiones de México, sus fructificaciones silvestres son comercializadas en mercados populares. En el laboratorio se ha cultivado en madera de pino, uno

de los residuos forestales más abundantes en el país (8, 9).

Otros hongos con los que se ha experimentado son *Laetiporus sulphureus*, también conocido como “pechuga de pollo” por su delicado sabor y consistencia (59) y *Flammulina velutipes*, denominado “hongo de invierno” (32). Ambas especies tienen potencial en el uso de desechos forestales, la primera, en residuos de encino y la segunda, en pino, además de que se venden en los mercados populares.

Determinación de la actividad enzimática de las cepas

Los hongos de pudrición blanca y oscura (27), entre los que se encuentra la mayoría de las especies comestibles cultivadas, producen gran variedad de enzimas extracelulares. Estas son capaces de degradar complejos sustratos lignocelulósicos en sustancias de bajo peso molecular que pueden ser absorbidos por el micelio para su nutrición (1). Entre las enzimas involucradas en ese proceso degradativo se encuentran la celulasa (EC 3.2.1.4) y la lacasa (EC 1.10.3.2), ambas son reguladas durante el ciclo de crecimiento y consideradas importantes en la morfogénesis del hongo (18). Las lacasas tienen la habilidad de oxidar sustratos con alto potencial redox ante la presencia de mediadores sintéticos, los cuales permitan la degradación de compuestos xenobióticos (51, 60). Las lacasas presentan su máxima actividad durante la colonización del sustrato, aunque algunos trabajos previos han detectado actividad de la enzima durante la morfogénesis del hongo (24). Por su parte, las celulasas han sido detectadas principalmente durante la formación y el desarrollo de los cuerpos fructíferos, sugiriendo un importante

papel en la previsión de carbono por el hongo para alcanzar su etapa reproductiva (10).

Diversas cepas de *Pleurotus* y *Lentinula* resguardadas en el Cepario Inecol han sido estudiadas, con la finalidad de determinar su capacidad de actividad enzimática y adaptación fisiológica a sustratos de disponibilidad regional, como la pulpa de café. Las investigaciones han incluido no solo la determinación de la actividad enzimática, sino también la capacidad de degradar fenoles hidrosolubles y cafeína, lo que ha permitido seleccionar cepas altamente transformadoras de compuestos antifisiológicos y/o capaces de reducir sustancialmente el contenido lignocelulósico del sustrato (54, 60, 61, 70).

Otro importante aspecto investigado ha sido las relaciones antagónicas entre las especies comestibles cultivadas y sus contaminantes. Esto, especialmente con los mohos del género *Trichoderma*, con la finalidad de aislar y seleccionar cepas que presenten mejor resistencia al ataque del hongo en cultivos con sustratos no convencionales (35, 61).

Conservación de las cepas

El objetivo primordial del Cepario IE es la conservación adecuada *ex situ* de los micelios de hongos. Sin embargo, esta tarea no solo implica el resguardo del organismo vivo, sino además, es fundamental mantener su pureza, viabilidad, capacidad de esporulación y fructificación, evitando cambios genómicos no deseables y, en la medida de lo posible, el envejecimiento de las cepas (53). Por tal motivo, el uso de sistemas eficientes y seguros de conservación de los micelios es una de las prioridades del Cepario IE. La conservación a largo plazo de las propiedades especiales y características de las cepas requiere de mantenimiento continuo. El método más utilizado, que implica resiembras continuas de los micelios en medio de cultivo artificial, también llamado método tradicional, es un sistema que asegura la conservación de las cepas por períodos cortos. Sin embargo, este sistema puede incrementar el riesgo de contaminación accidental y/o cambios en las características morfológicas y fisiológicas de las cepas (22).

El método de resiembras continuas (64) requiere de higiene estricta y de control medio ambiental, ya que las cepas deben ser mantenidas a 4 °C en condiciones de oscuridad para evitar el envejecimiento y la degeneración causada por factores como patógenos, mutaciones y la actividad metabólica de la propia cepa. Las resiembras de las cepas se realizan tomando una pequeña porción de la zona periférica del micelio, la cual es transferida a una caja de Petri o tubo de ensaye con medio de cultivo recién preparado. Los medios de cultivo más utilizados en México para el mantenimiento de cepas de hongos comestibles son agar con papa y dextrosa, agar con extracto de malta y agar Saboraud. Cuando el micelio cubre cerca del 70% del medio de cultivo en la caja de Petri, se debe almacenar a 4-5 °C en oscuridad (refrigeración). En estas condiciones las cepas se pueden almacenar, dependiendo de la especie, por un periodo de 3 a 4 meses. Después, el micelio tendrá que ser resembrado nuevamente para evi-

tar el envejecimiento o la muerte del mismo. En el Cepario IE se utiliza parcialmente el método tradicional, ya que todas las cepas deben ser preadaptadas a alguno de los medios de cultivo para facilitar su manejo, sobre todo para la prepara-

ción de inóculo y su posterior cultivo en sustratos lignocelulósicos (13). El método tradicional no es recomendable para colecciones con un gran número de cepas, ya que consume tiempo y es muy laborioso por las resiembras continuas del material.

Viabilidad de cepas criogenizadas

Distintos métodos de conservación han sido desarrollados para mantener las cepas por períodos largos y asegurar su estabilidad genética. Actualmente el método de congelación en nitrógeno líquido es considerado el más eficiente para la conservación de cepas de hongos que no esporulan en el micelio (6). El proceso de congelación se debe realizar de manera muy cuidadosa para que los micelios se puedan congelar y descongelar manteniendo la viabilidad de los mismos. Debe evitarse la formación de grandes cristales de agua en el interior de las células fúngicas debido a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C), lo cual puede causar daños irreversibles en las mismas. Para esto, es necesario utilizar soluciones crioprotectoras (40), las cuales generalmente son aceites que penetran al interior de la célula y evitan la formación de grandes cristales de agua manteniendo la integridad de la pared celular.

Los primeros estudios sobre la conservación de hongos por el método de criogenización se realizaron en la segunda mitad del siglo pasado (19), desde entonces, se han probado diferentes condiciones y materiales para optimizar el proceso. La viabilidad de las muestras que se van a congelar depende de la especie de hongo y de la cepa, así como de la edad del micelio, sus condiciones de

cultivo; también es importante la selección del tipo de crioprotector utilizado, su rapidez de penetración en las células del hongo y el sistema de congelación y descongelación (6, 36). La criopreservación de los hongos superiores generalmente se realiza utilizando fragmentos de medio de agar con micelio, los cuales son inmersos en una solución de crioprotector, las muestras se enfrían gradualmente desde la temperatura ambiente hasta -40 °C a una tasa de disminución de la temperatura de 1 °C/min (63). Para la congelación de cepas también se ha utilizado inóculo preparado a partir de semillas de gramíneas (20, 25, 67, 21).

En el Instituto de Ecología, A.C. se ha desarrollado un método sencillo para la conservación de cepas de hongos comestibles utilizando inóculo de las mismas preparado en semillas de gramíneas. Dicho método ha permitido recuperar cepas de los géneros *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus* y *Volvariella* (34, 36, 38, 46). La utilización de semillas como vectores para la conservación del micelio ha resultado altamente eficiente. En la mayoría de los casos, el micelio se recupera a partir del “hilio” de la semilla, lo que permite suponer que este actúa como un protector contra la congelación (Fig. 10). Esta hipótesis ha sido corroborada al recuperar micelios que fueron congelados sin crioprotector (42, 34).



Figura 10. Criopreservación de las cepas: a) congelamiento; b-c) recuperación.
(Fotos de Gerardo Mata y Rigoberto Gaitán Hernández).

El método implementado (36) utiliza como vectores principalmente semillas de sorgo (*Sorghum vulgare*) preparadas con el método convencional

para la elaboración del inóculo de hongos, sobre las semillas hidratadas (65%) y esterilizadas (13). Sin embargo, con mucho éxito, otro tipo de semillas

como trigo, arroz, mijo, linaza, etc. ha sido probado. Las semillas son colocadas en cajas de Petri estériles, donde se inoculan con los micelios fúngicos. Las muestras inoculadas son entonces incubadas en la oscuridad a la temperatura adecuada para el crecimiento micelial (25-28 °C) hasta que el micelio cubra completamente los granos de sorgo. Para el proceso de criogenización, las semillas colonizadas son colocadas en frascos pequeños de policarbonato conteniendo una solución crioprotectora, preparada con glicerol (10% v/v, para *Agaricus Lentinula* o *Pleurotus*) o dimetilsulfóxido (5% v/v, para *Volvariella*), previamente esterilizada a 121 °C/15 min. En cada frasco se colocan aproximadamente 25 semillas con micelio, las cuales se ponen en contacto con la solución crioprotectora durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se sumergen directamente en el nitrógeno líquido utilizando los contenedores apropiados (cajas de policarbonato). Cuando se desean recuperar las muestras, los frascos se sacan del contenedor y son introducidos en un baño maría de agua destilada a 30 °C, durante 10 min. Retirando el exceso de agua, los frascos son introducidos en

una solución de alcohol etílico (70% v/v) durante un minuto. Posteriormente, la solución crioprotectora contenida en los viales es drenada y las semillas son colocadas en cajas de Petri que contienen medio de cultivo sólido (agar con papa dextrosa), con la finalidad de inducir el crecimiento micelial de las muestras. Bajo estas condiciones de preservación, se alcanza una recuperación de las muestras cercana al 100%. Además, las cepas recuperadas después de varios años de almacenamiento han conservado sus índices de productividad de fructificaciones, así como la morfología y tamaño normal de los hongos desarrollados (38).

En México, solamente el Cepario del Instituto de Ecología utiliza la criogenización como sistema de conservación de cepas de hongos comestibles. Una de las desventajas de la criogenización es que requiere de personal altamente capacitado en el manejo del Cepario, así como una mayor disponibilidad financiera para la adquisición del equipo especializado y la recarga constante del nitrógeno líquido. Sin embargo, esto es compensado, ya que es altamente eficiente para preservar la viabilidad de las cepas por largos períodos.

Bibliografía citada

1. Buswell, J. A., Y. J. Cai, S. T. Chang, J. F. Peberdy, S. Y. Fu y H. S. Yu. 1996. Lignocellulolytic enzymes profiles of edible mushroom fungi. *World J. Microb. Biotech.* 12:537-542.
2. Camacho Sánchez, M. 2010. Estudio taxonómico del complejo de *Pleurotus*, *Lentinus* y *Panus* en México. Tesis de Maestría, Instituto de Ecología, Xalapa.
3. Chang, S. T. 2005. Witnessing the development of the mushroom industry in China. *Acta Edulis Fungi* 12 (supplement): 3-19.
4. Chang, S. T. y J. A. Buswell. 2008. Development of the world mushroom industry: applied mushroom biology and international mushroom organizations. *Int. J. Med. Mush.* 10:195-208.
5. Chen, A. W. 2005. Shiitake bag cultivation. In: Shiitake cultivation. *Mushroom growers' handbook* 2. *MushWorld*, Seoul. pp. 88-105.
6. Chvostová, V., F. Nerud, y L. Homolka. 1995. Viability of wood-inhabiting basidiomycetes following cryogenic preservation. *Folia Microbiologica* 40:193-197.
7. Delpéch, P. y J. M. Olivier. 1991. Cultivation of shiitake on straw based pasteurized substrates. *Mush. Sci.* 13:523-528.
8. Gaitán-Hernández, R. 2000. Obtención de cepas de *Neolentinus suffrutescens* por entrecruzamiento, su caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos a nivel de planta piloto. *Rev. Iberoam. Mic.* 17:20-24.
9. Gaitán-Hernández, R. y D. Salmenes. 1996. Cultivo y Selección de cepas de *Pleurotus* spp. con alto rendimiento. *Rev. Mex. Mic.* 12:107-113.
10. Geetha, D. y K. Sivaprakasam. 1998. Enzyme and sporophore production potential of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). *Mush. Res.* 7:39-42.
11. Guzmán, G. 1998. Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos en México. En: G. Halffter (comp.) *La diversidad biológica de Iberoamérica, II*. Instituto de Ecología, Xalapa. pp. 111-175.
12. Guzmán, G. 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): diversity, taxonomic problems and cultural and traditional medicinal uses. *International J. Med. Mush.* 2:95-123.
13. Guzmán, G., G. Mata, D. Salmenes, C. Soto y L. Guzmán Dávalos. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. IPN - CECODES, México, D.F.
14. Guzmán, G., L. Montoya, G. Mata y D. Salmenes. 1994. Studies in the genus *Pleurotus*, III. The varieties of *P. ostreatus*-complex based in interbreeding strains and in the study of basidiomata obtained in culture. *Mycotaxon* 50:365-378.
15. Guzmán, G., L. Montoya, V. M. Bandala, G. Mata y D. Salmenes. 1995. Studies in the genus *Pleurotus*, IV. Observations on the pink forms growing in Mexico based in the interbreeding of two different strains. *Mycotaxon* 53:247-259.
16. Guzmán, G. y D. Martínez-Carrera. 1985. Planta productora de hongos comestibles sobre pulpa de café. *Ciencia y Desarrollo* 65:41-48.
17. Hawksworth D.L. 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Stud. Mycol.* 50:9-18.
18. Heinzkill, M. y K. Messner. 1997. The lignolytic system of fungi. In: Anke, T. (ed). *Fungal Biotechnology*. Chapman y Hall, Weinheim. pp. 213-221.
19. Hwang, S. W. 1960. Effects of ultra low temperatures on the viability of selected fungus strains. *Mycologia* 52:527-529.
20. Hwang, S. W. y J. P. San Antonio. 1972. Stability of spawn stocks of the cultivated mushroom after 26 months liquid nitrogen refrigeration (-160 °C to -196 °C). *Mush. Sci.* 8:35-42.
21. 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. *Cryobiology* 19:602-606.
22. Jong, S. C. y E. E. Davis. 1986. Germoplasm preservation of edible fungi in culture through cryogenic storage. In: West, P. J., D. J. Royse and R. B. Beelman (eds.). *Cultivating Edible Fungi*. Elsevier, Nueva York. pp. 213-225.
23. Julián-Carlos, A. y D. Salmenes. 2006. Cultivo de *Volvariella volvacea* en residuos de la cosecha de plátano y paja de cebada. *Rev. Mex. Mic.* 23:87-92.
24. Kaviyaranan, V. y K. Natarajan. 1997. Changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting of *Pleurotus cornucopiae* var. *Citrinopileatus*. In: Rai, R. D., B. L. Dhar, B. L. y R. N. Verma (eds.). *Advances in Mushroom Biology and Production*. National Research Centre for Mushroom, Solan. pp. 309-320.

25. Kneebone, L. R., S. W. Hwang, P. G. Shultz y 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. *Mush. Sci.* 9:229-235.
26. Largeteau, M. L., G. Mata y J. M. Savoie. 2004. *Vericillium fungicola* var. *fungicola* affects *Agaricus bisporus* cultivation in Mexico. *FEMS Microbiology Letters* 236:191-196.
27. Leonowicz, A., A. Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. Wojtas-Wasilewska, N. S. Cho, M. Hofrichter, y J. Rogalski. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fung. Gen. Biol.* 27:175-183.
28. Luo, X. C. 2004. Progress of xiang-gu (shiitake) cultivation in China. *Mush. Sci.* 15:307-311.
29. Martínez-Carrera, D. 2002. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Mic. Apl. Int.* 14: 61-74.
30. Martínez-Carrera, D., M. Bonilla, W. Martínez, M. Sobal, A. Aguilar y E. Pellicer-González. 2001. Characterisation and cultivation of wild *Agaricus* species from Mexico. *Mic. Apl. Int.* 13:9-24.
31. Martínez-Carrera, D., M. Sobal, M. Quitarte y G. Guzmán. 1988. El cepario de hongos comestibles del Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. *Ciencia* 39:113-120.
32. Mata, G. 1987. Comportamiento de una cepa extranjera de *Flammulina velutipes* en tres medios de cultivo. *Rev. Mex. Mic.* 3:39-46
33. Mata, G., A. Rodríguez y P. Callac. 2002. Aislamiento, cultivo y evaluación de una cepa mexicana silvestre de champiñón *Agaricus bisporus* y su comparación con cepas comerciales, Resúmenes. IV Congreso Latinoamericano de Micología. Xalapa. 500 p.
34. Mata, G. y A. E. Rodríguez Estrada, 2005. Viability in spawn stocks of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*, after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. *J. Agric. Tech.* 1:153-162.
35. Mata, G., D. M. Murrieta Hernández y L. G. Iglesias Andreu. 2005. Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. *W. J. Microb. Biotech.* 21:143-150.
36. Mata, G., D. Salmones y P. Ortega. 2000. Viability and mushroom production of *Lentinula edodes* and *L. boryana* strains (Fungi: Basidiomycetes) after cryogenic storage of spawn stocks. *W. J. Microb. Biotech.* 16:283-287.
37. Mata, G., D. Salmones y G. Guzmán. 1990. Cultivo del shiitake japonés, *Lentinus edodes*, en bolsas con viruta de madera. *Rev. Mex. Mic.* 6:245 - 251.
38. Mata, G., D. Salmones y R. Gaitán-Hernández. 2004. Spawn viability and mushroom production in *Pleurotus* strains frozen for eight years in liquid nitrogen. In: Romaine, P., P. Keil, D. L. Rinker y D. J. Royse (eds.). *Science and cultivation of edible and medicinal fungi*. Penn State University, University Park. pp. 185-191.
39. Mata, G. y D. Salmones. 2003. Edible mushroom cultivation at the Institute of Ecology in Mexico. *Micol. Apl. Int.* 15:23-29.
40. Mata, G. y D. Salmones. 2005. Preservation of shiitake spawn stocks by cryogenic storage. In: *Shiitake cultivation. Mushroom growers' handbook 2*. Mushroom World, Seoul. pp. 51-55.
41. Mata, G. y G. Guzmán, 1993. Cultivation of *Lentinus boryanus* in wood shavings in México. *Cryptog. Bot.* 4:47 - 49.
42. Mata, G. y R. Pérez-Merlo. 2003. Spawn viability in edible mushrooms alter freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. *Criobiology* 47:14-20.
43. Nicholson, M. S., B. A. Bunyard y D. J. Royse. 1997. Phylogeny of the genus *Lentinula* based on ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism analysis. *Mycologia* 89:400-407.
44. Pérez Merlo, R. 1998. Determinación del patrón de sexualidad de cepas mexicanas de *Auricularia fuscusuccinea* y su cultivo sobre pulpa de café y aserrín. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. Xalapa.
45. Pérez-Merlo, R. y G. Mata. 2005. Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* en viruta de pino: obtención de nuevas cepas y evaluación de su producción. *Rev. Mex. Mic.* 20:53-59.
46. Pérez, R. y D. Salmones. 1997. Viabilidad de cepas de *Volvariella volvacea* conservadas en nitrógeno líquido. *Rev. Mex. Mic.* 13:78-80.
47. Mata, G. y R. Gaitán Hernández. 1994. Avances en el cultivo del shiitake en pulpa de café. *Rev. Iberoam. Micol.* 11:90-916.
48. Mora, V. M. y D. Martínez Carrera. 2007. Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México. En: Sánchez Vázquez, J. E., D. Martínez Carrera, G. Mata y H. Leal Lara (eds.). *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. Ecosur, Tapachula. pp. 7-25.
49. Morales P., D. Martínez-Carrera y W. Martínez-Sánchez. 1991. Cultivo de shiitake sobre diversos substratos en México. *Mic. Neotrop. Apl.* 4:75-81.

50. Morales P. y D. Martínez-Carrera. 1991. *Bursera* sawdust as a substrate for shiitake cultivation. *Mic. Neotrop. Apl.* 4:41-47.
51. Rodríguez, E., O. Nuero, F. Guillén, A. T. Martínez y M. J. Martínez. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol. Biochem.* 36:906-916.
52. Royse, D. J. 2007. Consumo y producción de *Agaricus bisporus* en el mundo. En: Sánchez, J. E., D. J. Royse y H. Leal Lara (eds.). *Cultivo, mercado-tecnia e inocuidad alimentaria de Agarics bisporus*. Ecosur, Tapachula. pp. 7-17.
53. Ryan M. J. y D. Smith. 2004 Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. *Mycol. Res.* 108(12):1351-1362.
54. Salmones, D., G. Mata, K. Waliszewski. 2005. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate degradation. *Biores. Technol* 96:537-544.
55. Salmones, D., G. Mata, G. Guzmán, M. Juárez y L. Montoya. 1995. Estudios sobre el género *Pleurotus*, V. Producción a nivel de planta piloto de ocho cepas adscritas a cinco taxa. *Rev. Iberoam. Mic.* 12:108-110.
56. Salmones, D., G. Mata, L. M. Ramos y K. Waliszewski. 1999. Cultivation of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. *Agronomie: Agric. Environ.* 19:13-19.
57. Salmones, D., K. N. Waliszewski y G. Guzmán. 1996. Use of some agro-industrial lignocellulose by-products for edible mushroom *Volvariella volvacea* cultivation. *Rev. Int. Cont. Amb.* 12(2):69-74.
58. Salmones, D., R. Gaitán-Hernández, R. Pérez, G. Guzmán. 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus* VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Rev. Iberoam. Mic.* 14:173-176.
59. Salmones, D., V. Álvarez, G. Mata y G. Guzmán. 1990. Estudio de una cepa mexicana de *Laetiporus sulphureus* (Polyporaceae) bajo diferentes condiciones de cultivo en el laboratorio. *Rev. Mex. Mic.* 6:253 - 257.
60. Salmones, D. y G. Mata. 2002. Detection of extracellular enzymes produced by *Pleurotus* spp. grown on coffee pulp. In: Sánchez, J. E., G. Huerta y E. Montiel (eds.). *Mushroom Biology and Mushroom Products*, 4th International Conference. Universidad Autónoma de Morelos. Cuernavaca. pp. 213-220.
61. Salmones, D. y G. Mata, 2005. Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus* spp. *Rev. Mex. Mic.* 21:63-69.
62. Salmones D. y M. T. Gutiérrez Lecuona. 2008. Cultivation of Mexican *Lentinus boryanus* (Berk. et Mont.) Sing. (Agaricomycetidae) strains on alternative substrates. *Int. J. Med. Mush.* 10(1):73-78.
63. Smith, D. 1998. The use of cryopreservation in the *ex-situ* conservation of Fungi. *Cryo-Letters* 19:79-90.
64. Smith D. y A. H. S. Onions. 1994. The preservation and maintenance of living fungi, 2nd ed. CAB International, Wallingford.
65. Sosa, V. 2004. Bancos de germoplasma. En: Carnevalli Fernández-Concha, G., V. Sosa, J. L. León de la Luz y J. León Cortés (eds.). *Colecciones biológicas*, Centros de Investigación Conacyt, México, D.F. pp. 12-13.
66. Soto-Velazco C., S. Fausto y L. Guzman-Davalos. 1995. Cultivation of the mushrooms *Lentinus boryanus* and *L. edodes* on a mixture of maguey tequilero bagasse and sugar cane bagasse. *Afr. J. Mycol. Biotech.* 3:115-120.
67. Suman, B. C. y 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 J. Mycol. Plant Path.* 21:34-37.
68. The culture collections in this world. WDCM statistics. 2011. <http://wdcm.nig.ac.jp/statistics.html> (11 de marzo de 2011).
69. Tokimoto, K. 2005. Shiitake log cultivation. In: *Shiitake cultivation. Mushroom growers' handbook* 2. MushWorld, Seoul. pp. 56-73.
70. Velázquez-Cedeño, M. A., G. Mata y J. M. Savoie. 2002. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *W. J. Microb. Biotech.* 18:201-207.
71. Vela, R. y D. Martínez-Carrera. 1989. Cultivation of *Volvariella bakeri* and *V. volvacea* in Mexico: a comparative study. *Mush. J. Trop.* 9:99-108.
72. Vogel, F. y D. Salmones. 2000. Análisis comparativo de la productividad de cepas de *Pleurotus* spp. cultivadas en una planta comercial. *Rev. Iberoam. Mic.* 17:138-141.