

Подбор эффективных протекторных сред для криоконсервирования мицелиальных грибов

А.В. КАНТЕРОВА¹, И.С. ВАЖИНСКАЯ¹, Г.И. НОВИК¹, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Selection of Efficient Protective Media for Cryopreservation of Mycelial Fungi

A.V. KANTEROVA¹, I.S. VAZHINSKAYA¹, G.I. NOVIK¹, I.P. VYSEKANTSEV²

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Криоконсервирование мицелиальных грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Laetiporus*, *Inonotus*, *Paecilomyces*, *Rhizoctonia*, проводили в жидком азоте. В качестве криопротекторов использовали ДМСО, 5% об.; глицерол, 10% об.; лактозу, 10%; 10%-е обезжиренное молоко. Перед замораживанием культуры выращивали 14 суток на сусло-агаре, затем образцы выросшего мицелия помещали в криопробирки с протектором, выдерживали 20 мин и быстро погружали в жидкий азот. После хранения в течение 3-х суток образцы размораживали при 37°C и определяли процент выживаемости грибов. Культуры родов *Laetiporus*, *Inonotus*, *Paecilomyces* сохраняли 100% выживаемость при использовании в качестве протекторов ДМСО, глицерола и обезжиренного молока и ~90% в случае лактозы. Без использования протекторных сред выживаемость составляла не более 80%.

Такой результат можно объяснить тем, что к родам *Laetiporus* и *Inonotus* относятся афиллофорные дереворазрушающие трутовые грибы, и в лабораторных условиях, как правило, приходится работать с их мицелием, расположенным в апикальной зоне колоний, в которой гифы тонкостенные и менее устойчивые к воздействию стрессовых факторов. Относительно представителей примитивных форм гимноасковых грибов *Paecilomyces* следует отметить, что гифы мицелия на всей поверхности колоний тонкие и легко травмируются. Таким образом, криоконсервирование грибов этих таксономических групп без протекторных сред нецелесообразно. То, что при использовании глицерола, обезжиренного молока и ДМСО эти культуры полностью сохраняли выживаемость, можно объяснить максимальной доступностью их мицелиальных клеток для криопротекторов. Микофильные несовершенные грибы рода *Rhizoctonia* имели низкие показатели выживаемости без использования протекторных сред, хотя считается, что грибы этого рода отличаются высокой криоустойчивостью. Возможно, за 14 суток выращивания мицелия не наступала достаточно зрелая стадия его развития, и время культивирования следовало увеличить. Процент выживаемости, полученные для грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium* при использовании всех вариантов криопротекторов, имели более высокие показатели, чем без них.

В результате исследований можно сделать вывод, что все проверенные нами криопротекторы оказались достаточно эффективными.

Cryopreservation of mycelial fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Laetiporus*, *Inonotus*, *Paecilomyces*, *Rhizoctonia* was performed in liquid nitrogen. We used DMSO, 5% v/v; glycerol, 10% v/v; lactose, 10%; 10% skimmed milk in water as cryoprotectants. Before freezing the cultures were grown for 14 days on wort agar, then the samples of grown mycelium were placed into cryovials with protectant, maintained for 20 min and rapidly plunged into liquid nitrogen. After 3-day-long storage the samples were thawed at 37°C and we determined the survival rate of fungi. Culture of genera *Laetiporus*, *Inonotus*, *Paecilomyces* preserved 100% survival when using protectants such as DMSO, glycerol and skimmed milk and ~90% in the case of lactose. Without application of protective media the survival was less than 80%.

This result may be explained by the fact that the genera *Laetiporus* and *Inonotus* include aphylllophoral wood-destroying *Polyporaceae* fungi and in the laboratory, as a rule, we have to work with their mycelium located in the apical zone of colonies where hyphae are thin-walled and less resistant to stress factors. Concerning the representatives of primitive forms of *Gymnoascaceae* fungi *Paecilomyces* we should note that hyphae of mycelium on the entire surface of colonies are thin and slightly injured. Thus cryopreservation of fungi of these taxonomic groups without protective media is unreasonable. The fact that when using glycerol, skimmed milk and DMSO these cultures entirely preserved the survival, can be explained by maximal availability of their mycelial cells for cryoprotectants. Micophil imperfect fungi *Rhizoctonia* had low survival rates without protective media, although it is believed that fungi of this genus are highly cryoresistant. Possibly during 14 days of growing mycelium sufficiently mature stage of its development does not occur and the culturing time should have been increased. The survival obtained for the fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium* after using all the types of cryoprotectants was higher comparing to the case of absent cryoprotectants.

Basing on our study we can conclude that all tested cryoprotectants were quite efficient.