



Протокол криоконсервации эндомикоризных грибов

В

I. Lalaymia, S. Cranenbrouck and S. Declerck.

Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi
Mycorrhiza (2013) – DOI 10.1007/s00572-013-0541-8

Адаптировано из

I. Lalaymia, S. Cranenbrouck, X. Draye and S. Declerck

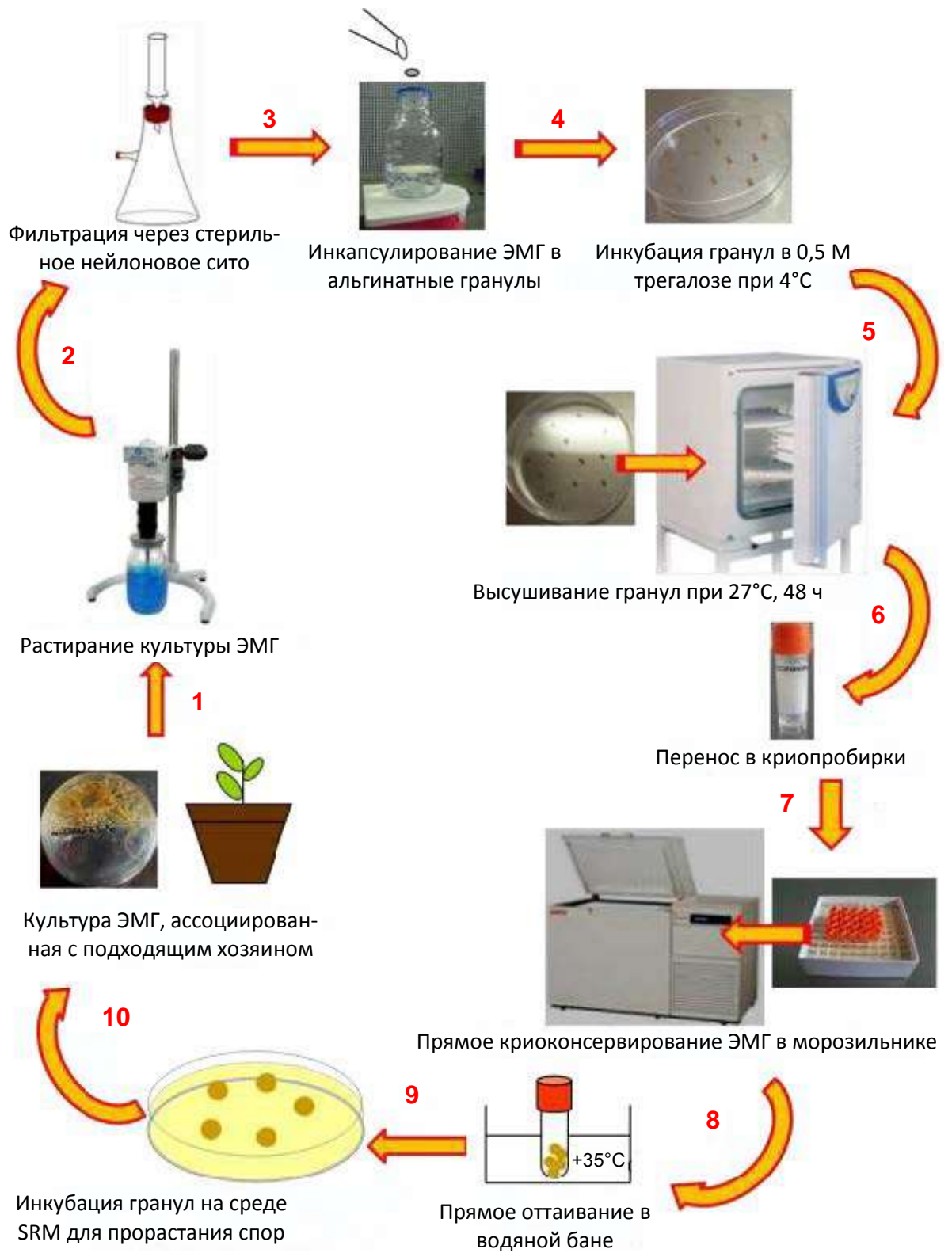
Preservation at ultra-low temperature of *in vitro* cultured arbuscular mycorrhizal fungi via entrapment-drying. Fungal Biology (2012) – 116:1032-1041.

I. Lalaymia, S. Declerck, F. Naveau and S. Cranenbrouck, Cryopreservation of arbuscular mycorrhizal fungi from root-organ and plant Mycorrhiza (2013) – doi:10.1007/s00572-013-0525-8

Протокол:

- (1) Желеобразную среду, содержащую споры и корни 5-месячной *in vitro* культуры, извлекают из чашек Петри, выливают в 100 мл стерилизованной (121°C, 15 мин) деионизированной воды и затем смешивают два раза в течение 30 с при 20000 об/мин в стерилизованном (121°C, 15 мин) миксере.
- (2) Смесь фильтруют через стерилизованный (121°C, 15 мин) нейлоновый фильтр (40 мкм).
- (3) Супернатант (споры и части микоризных/немикоризных корней) инкапсулируют в 2%-ном (в/о) растворе альгината натрия (50 ± 5 пропагул на гранулу).
- (4) Инкапсулированные пропагулы инкубируют в течение ночи в 0,5 М растворе трегалозы и
- (5) высушивают при 27°C в течение 48 ч (содержание воды в гранулах приблизительно 8,1±4,6 %).
- (6) Гранулы переносят в криопробирки объемом 2 мл.
- (7) Криопробирки хранят в морозильнике при -130°C после двухстадийного снижения температуры: быстрого снижения (~12°C мин⁻¹) от комнатной температуры (+20°C) до -110°C с последующим медленным снижением (~1°C мин⁻¹) от -110 до -130°C.
- (8) Для оживления инкапсулированные пропагулы ЭМГ прямо погружают в водяную баню при температуре +35°C.
- (9) Гранулы переносят в стерилизованную (121°C, 15 мин) среду MSR, охлаждают на водяной бане до 40°C и инкубируют при 27°C для прорастания.
- (10) После 4 недель инкубации, гранулы, содержащие пророщенные пропагулы, объединяют с отрезками корней в условиях культивирования *in vitro* для возобновления жизненного цикла грибов.

Lalaymia и др. (2013 - DOI: 10.1007/s00572-013-0525-8) адаптировали следующим образом этот протокол криоконсервации для пропагул, полученных в условиях *in vivo*. Отбирают горшечные культуры возрастом, по крайней мере, 5 месяцев. Споры собирают путем влажного просеивания и декантации, а корни собирают пинцетом и растирают в миксере со 100 мл деионизированной воды в течение 30 с при 20000 об/мин, и фильтруют, как описано выше. Споры и супернатант из растертых корней смешивают и инкапсулируют в альгинатные гранулы, сушат, криоконсервируют и оттаивают, как описано выше. После оттаивания инкапсулированные пропагулы помещают в непосредственном контакте с корнями растений в горшках, содержащих стерилизованный (2 × 15 минут при 121°C, с 12-часовым интервалом) субстрат. Растения выращивают в течение не менее 8 недель в ростовой камере до оценки жизнеспособности грибов после криоконсервации.





Protocol of cryopreservation of arbuscular mycorrhizal fungi.

In

I. Lalaymia, S. Cranenbrouck and S. Declerck.

Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi
Mycorrhiza (2013) – DOI 10.1007/s00572-013-0541-8

Adapted from

I. Lalaymia, S. Cranenbrouck, X. Draye and S. Declerck

Preservation at ultra-low temperature of in vitro cultured arbuscular mycorrhizal fungi via entrapment-drying

Fungal Biology (2012) – 116:1032-1041.

I. Lalaymia, S. Declerck, F. Naveau and S. Cranenbrouck, Cryo-
preservation of arbuscular mycorrhizal fungi from root-organ and
plant Mycorrhiza (2013) – doi:10.1007/s00572-013-0525-8

Protocol:

- (1) Gelling medium, containing spores and roots of a 5-month old in vitro culture, is extracted from the Petri dishes, poured into 100 ml of sterilized (121 °C for 15 min) deionized water and subsequently blended twice for 30 s at 20,000 rpm in a sterilized (121 °C for 15 min) mixer
- (2) The mixture is filtered on a sterilized (121 °C for 15min) nylon filter (40 mm).
- (3) The supernatant (spores and mycorrhizal/nonmycorrhizal root pieces) is encapsulated in 2 % (w/v) solution of sodium alginate (50±5 propagules per bead).
- (4) The encapsulated propagules are incubated overnight in 0.5Mtrehalose and
- (5) dried at 27 °C for 48 h (bead water content of approximately 8.1±4.6 %).
- (6) Beads are transferred into 2-ml cryovials.
- (7) The cryovials are cryopreserved in a freezer at -130 °C following a two-step decrease in temperature: a fast decrease (~12 °C min⁻¹) from room temperature (+20 °C) to -110 °C followed by a slow decrease in temperature (~1 °C min⁻¹) from -110 to -130 °C.
- (8) For revival, the encapsulated AMF propagules are directly plunged in a water bath at +35 °C.
- (9) The beads are dropped into sterilized (121 °C for 15 min) MSR medium, cooled in a water bath to 40 °C, and incubated at 27 °C for germination.
- (10) After 4-weeks incubation, beads containing germinated propagules are associated with an excised root under in vitro culture conditions to reinitiate the fungal life cycle.

Lalaymia et al. (2013 – doi:10.1007/s00572-013-0525-8) adapted as follows this cryopreservation protocol to in vivo produced propagules: Pot cultures, at least 5 months old, are sampled. Spores are collected by wet sieving and decanting, while roots are collected with forceps and blended in a mixer in 100 ml deionized water for 30 s at 20,000 rpm, and filtered as above. The spores and the supernatant of the blended roots are mixed together and encapsulated in alginate beads, dried, cryopreserved, and thawed as described above. After thawing, the encapsulated propagules are placed directly in contact with roots of plants in pots containing a sterilized (2×15min at 121 °C, with 12-h interval) substrate. The plants are grown for at least 8 weeks in a growth chamber before assessing the fungal viability following cryopreservation.