

МИКОЛОГИЯ

УДК 582.284

ХАРАКТЕРИСТИКА РЯДА ДИКОРАСТУЩИХ ШТАММОВ ВЕШЕНКИ С ЦЕЛЬЮ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОМ ГРИБОВОДСТВЕ

В.Е.Никитина, Н.А.Маринина*, В.А.Болдырев*, Р.А.Озерова**

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

**Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского*

***Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова*

Достаточно широкое культивирование грибов рода *Pleurotus* во многих странах мира, в том числе и России, обусловлено их способностью расти и плодоносить на самых разных лигноцеллюлозных субстратах. Рентабельность производств по выращиванию вешенки во многом зависит от особенностей и состояния культуры применяемой в производстве. Поэтому грибоводство, как отрасль, постоянно нуждается в появлении новых высокоурожайных штаммов. В связи с этим необходим целенаправленный и расширенный поиск и выделение в чистую культуру дикорастущих штаммов вешенки, которые могут использоваться как для непосредственного культивирования, так и в качестве селекционного материала.

Целью настоящей работы было осуществление поиска и выделение культур дикорастущих грибов рода *Pleurotus*, определение видовой принадлежности выделенных штаммов, изучение их свойств и урожайности в сравнении со штаммами, уже широко используемыми в производстве.

Объектом исследований служили штаммы Зоммер и Флорида из коллекции высших грибов лаборатории микробиологии и микологии ИБФРМ РАН, а также четыре дикорастущих изолята *Pleurotus*, обозначенные как Д1, Д2, Волжский, Академический. Сбор плодовых тел грибов, принадлежащих к роду *Pleurotus*, осуществлялся в лиственных и смешанных лесах Саратовской области. Выделение чистых культур с базидиом проводилось по стандартной методике тканевым способом. Культуры подвергались микроскопическому контролю и очистке от посторонней микрофлоры с помощью обычных методов микробиологической техники (Методы ..., 1982). Сведения о местах сбора грибов и древесных породах представлены в таблице 1.

Для определения видовой принадлежности выделенных штаммов использовали описание некоторых характерных признаков плодовых тел, предложенное Л.В. Гарибовой с сотр. (1992). Результаты показали, что базидиомы образуют сростки по 4-7 (реже более 7) штук; шляпка 10-12 см в диаметре, округлая, раковиновидная, плоская, реже воронковидная; пластинки серовато-белые до кремовых, низбегающие; ножка 3-6 x 1,1-2 см, серовато-белая, в нижней части опушенная; мякоть серовато-белая, плотная; споровый порошок лилово-серый. Таким образом, по признакам базидиом найденные дикорастущие изоляты были определены как принадлежащие к виду *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm.

Для подтверждения видовой принадлежности, кроме исследований на стадии плодовых тел, проводили определение культур по ключу, касающемуся их мицелиальных форм, предложенному теми же авторами (Гарибова и др., 1992). В связи с этим изучались характеристики роста выделенных культур на сусло-агаре в чашках Петри: скорость роста, зональность колонии гриба, структура и окраска мицелия, определение качественных реакций на полифенолоксидазы.

Таблица 1. Первичные сведения о выделенных дикорастущих штаммах вешенки

Штамм	Период сбора	Место сбора (Адм. район)	Древесная порода	Дата получения плодовых тел в лабораторных условиях
Д1	сентябрь 98	Лысогорский	<i>Populus nigra</i>	07.05.99
Д2	октябрь 98	Базарно-Карабулакский	<i>Ulmus pumila</i>	05.05.99
Волжский	октябрь 98	Базарно-Карабулакский	<i>Tilia cordata</i>	31.04.99
Академический	октябрь 98	Воскресенский	<i>Populus tremula</i>	02.05.99

Для изучения линейного роста изучаемую культуру высевали равным количеством в центр чашки Петри с сусло-агаром и выращивали в термостате при 26°C. Диаметр колонии измеряли в двух взаимно перпендикулярных направлениях на 3, 5, 7, 9 сутки роста. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Линейный рост штаммов *P. ostreatus* на среде сусло-агар

Штамм	Радиус колонии, мм			
	3-й сутки	5-е сутки	7-е сутки	9-е сутки
Д1	10,6	20,7	35,2	43,0*
Д2	7,3	19,3	33,8	43,0*
Волжский	10,5	23,8	35,5	43,0*
Академический	13,4	27,4	43,0*	-

* Полное зарастание чашки Петри

Наиболее быстрый рост, т. е. полное зарастание чашки Петри с сусло-агаром на 7-е сутки культивирования, наблюдался у штамма Академический.

Штаммы Д1 и Волжский имеют практически равные показатели, а штамм Д2 наименее активен среди исследуемых культур по показателям линейного роста колоний.

Все выделенные штаммы по скорости роста (табл.3) относятся к быстрорастущим, что характерно для производственных штаммов *P. ostreatus* (Лекомцева и др., 1997). По типу окраски мицелия среди изучаемых штаммов наблюдалось некоторое однообразие. Штаммам Д1, Волжский и Академический свойственна белая окраска, штамму Д2 - светло-желтая.

Таблица 3. Основные показатели ключа к определению видовой принадлежности выделенных штаммов *P. ostreatus*

Штамм	Структура мицелия	Зональность колонии	Скорость роста, см/сут	Окраска мицелия	Цветовая реакция с	
					бензидином	α -нафтолом
Д1	высокий, пушистый	слабо выражена	0,50	белая	коричневая	фиолетовая
Д2	высокий, пушистый	слабо выражена	0,48	светло-желтая	коричневая	фиолетовая
Волжский	высокий, пушистый	ярко выражена	0,50	белая	коричневая	фиолетовая
Академический	высокий, пушистый	ярко выражена	0,50	белая	коричневая	фиолетовая

При этом у Д2 на 7-е сутки роста появлялось кольцо с янтарно-желтым окрашиванием. Изученным штаммам *P. ostreatus* на первых этапах роста не свойственно проявление зональности. Позднее, к 7-м суткам, появляется выраженная зональность. В процессе роста мицелий имеет равномерно-пушистую структуру. К 9-м суткам или позднее иногда формируются мицелиальные тяжи с узелками, как показатель старения мицелия.

Известно, что при идентификации мицелиальных ксилотрофов в природных субстратах необходимо знать особенности вегетативных структур грибов. Среди исследований морфологии мицелия ксилотрофов с помощью микроскопии следует отметить работу А.С. Бухало и др. (1985), где рассматриваются особенности мицелия *in vitro* у культивируемых видов съедобных грибов. Характерной морфологической особенностью гиф высших базидиомицетов является наличие пряжек на диплоидном мицелии, которые представляют собой небольшие дугообразной формы клетки, расположенные против поперечной перегородки гифы. При многократных пассажах в лабораторных условиях может идти процесс дедикариотизации гиф, сопровождающийся потерей пряжек, что, в свою очередь, приводит к потере урожайности, т.е. снижению образования плодовых тел (Бухало и др., 1988). В связи с этим вопрос о стабильности морфологического признака, а именно наличия пряжек на гифах, имеет большое значение.

В нашей работе определялось число пружек на мицелии 9-дневных культур *P. ostreatus*. В процессе исследования были отмечены различия во внешнем виде и количестве пружек, а также толщине гиф мицелия дикорастущих штаммов. Как видно из таблицы 4 и в связи с вышеизложенным, можно предположить, что штаммы Д1 и особенно Академический наиболее урожайные из всех в нашем эксперименте.

Таблица 4. Особенности внешнего вида мицелия *P. ostreatus* в световом микроскопе (40x10)

Штамм	Количество пружек	Вид пружек	Сравнительная толщина гиф
Д1	3,7 ± 0,2	одиночные, медальонные	средние
Д2	1,6 ± 0,1	парные, медальонные	тонкие
Волжский	2,6 ± 0,4	мелкие, одиночные, без зазора	средние
Академический	2,8 ± 0,1	крупные, одиночные, медальонные	толстые

Проведены сравнительные исследования физиологии роста и накопления биомассы выделенных культур и производственных штаммов Зоммер и Флорида на жидкой питательной среде – 2 пивном сусле.

Как видно из рис. 1, исследуемые штаммы к 7-м суткам выращивания разделились на 3 группы: штамм Д2 накапливает менее 2 г/л, Зоммер, Волжский, Флорида и Академический – от 2 до 3 г/л, штамм Д1 – более 3 г/л сухой биомассы. Но к 14 суткам картина меняется. Штаммы Академический и Д2, накапливая биомассу с прежней интенсивностью, показывают наименьшие результаты – 4,38 и 2,74 г/л соответственно. Штамм Д1, резко снижая активность, теряет ведущее положение – 5,57 г/л, в то время как Зоммер, Волжский и Флорида увеличивают темпы накопления биомассы. Причем Волжский (7,24 г/л), незначительно уступаю штамму Зоммер (8,27 г/л), показывает большие результаты, нежели Флорида (6,19 г/л). В связи с этим штаммы Волжский и Д1 представляют интерес в качестве продуцентов биомассы кормового и пищевого назначения, а также промежуточного жидкого посевного материала для производства коммерческого мицелия.

Параллельно с определением сухой массы мицелия проводили микроскопические исследования глубинного мицелия. В глубинной культуре внутривидовые штаммовые различия, заметные у мицелия, выращенного на твердом субстрате, не выражены.

Внешний вид пружек у всех 6 исследуемых штаммов принимает одинаковые очертания. Количество пружек на гифах чистой культуры приближается к 2 в поле зрения. Толщина гиф уменьшается по сравнению с субстратным мицелием.

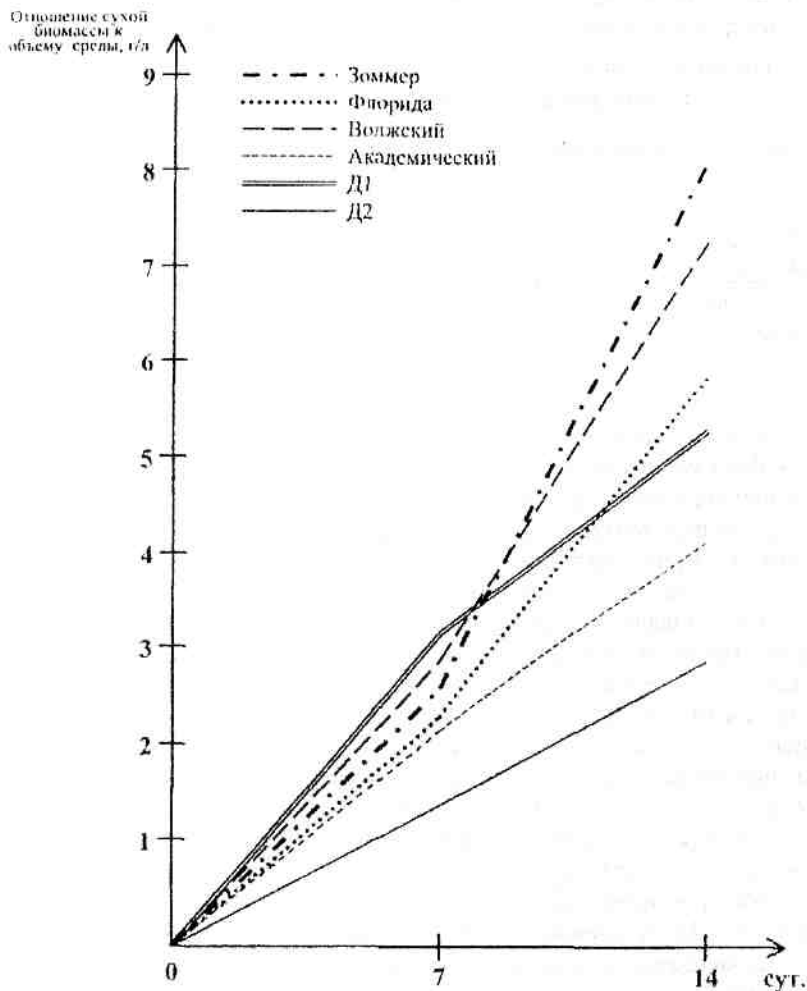


Рис. 1 Накопление сухой биомассы различными штаммами *P. ostreatus*.

Исследуемые штаммы показали высокую ферментативную активность. Изучение 6 штаммов *P. ostreatus* показало, что все они обладают полифенолоксидазной активностью (табл. 5).

У всех штаммов выявлено наличие лакказы и пероксидазы. Тирозиназа в пробах не обнаружена. Нужно отметить, что у выделенных нами 4 дикорастущих штаммов цветовые реакции на лакказу и пероксидазу проявлялись примерно через 10 мин после внесения реактива, а у производственных штаммов Зоммер и Флорида это время составляло 60 мин. Если учесть, что проявление реакции в течение ча-

са - показатель высокой активности, то полученные результаты свидетельствуют об очень высокой ферментативной активности изучаемых штаммов.

Таблица 5. Цветовые химические реакции (время появления окраски, мин после начала реакции) на оксидазы у *P. ostreatus*

Штамм	Фенолоксидазы	Лакказы	Тирозиназа	Пероксидаза
Д1	+	10	—	10
Д2	+	10	—	10
Волжский	+	10	—	10
Академический	+	10	—	10
<i>Sommer</i>	+	60	—	60
<i>Florida</i>	+	60	—	60

Для оценки урожайности дикорастущих штаммов *P. ostreatus* получали плодовые тела. В первую очередь необходим подбор контрольного штамма. В связи с тем, что наиболее распространенными в грибоводстве являются штаммы Зоммер и Флорида, мы сочли возможным использовать их в качестве стандарта.

Чтобы дать оценку урожайности новых штаммов по сравнению с производственными штаммами, мы постарались свести до минимума влияние всех посторонних факторов. В первую очередь следует обратить внимание на качество посевного мицелия. Необходимым условием является его однородность, т.е. он выращен на субстрате одного происхождения, по одной технологии и имеет одинаковый возраст. Это важно в связи с тем, что от качества посевного материала зависит его приживаемость, а в конечном счете и урожайность грибов. В течение 2 недель с субстрата снимали плодовые тела с размером шляпки от 4 до 7 см и с ножкой не длиннее 4 см. В связи с тем, что плодовые тела вешенки очень гигроскопичны, и их масса может меняться с изменением влажности окружающей среды, определяли содержание сухого вещества в полученных плодовых телах, высушивая их до постоянного веса. Для оценки величины урожайности штаммов делали расчет по предложенному А.И. Ивановым и Л.В. Гариповой (1989) способу, исходя из общепринятой доли содержания воды в плодовом теле - 90% от массы гриба.

Полученные результаты позволяют судить об урожайности изучаемых штаммов. Из рис. 2 видно, что по этому показателю Академический превышает производственные штаммы, а Волжский, уступая Зоммер, все-таки урожайнее, чем Флорида. Штаммы Д1 и Д2 значительно отстают по этой характеристике как от Зоммер и Флорида, так и от дикорастущих Академического и Волжского.

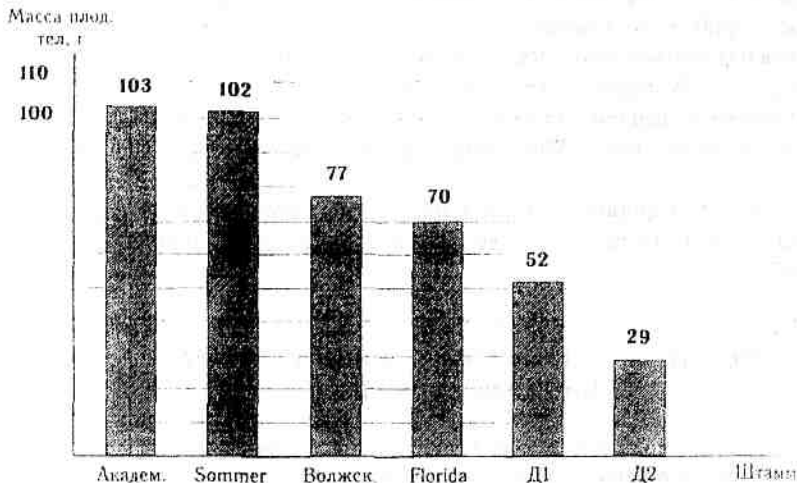


Рис. 2. Урожайность дикорастущих и производственных штаммов *P. ostreatus*

Таким образом, собранные в Саратовской области дикорастущие штаммы вешенки выделены в чистую культуру и зарегистрированы в коллекции высших грибов лаборатории микробиологии и микологии ИБФРМ РАН как Д1, Д2, Волжский и Академический. Установлено, что все 4 выделенные штамма являются *P. ostreatus* (Fr.) Kuntz. - вешенка обыкновенная, или устричная. Наибольшим накоплением биомассы в жидкой культуре характеризуется штамм Волжский, который по этому показателю превосходит производственный штамм Флорида и незначительно уступает производственному штамму Зоммер. Другие исследуемые штаммы обладают меньшей скоростью накопления биомассы. Штамм Академический имеет наиболее высокую урожайность, по которой превышает производственные штаммы Зоммер и Флорида. Штамм Волжский характеризуется большей урожайностью, чем Флорида, но меньшей, чем Зоммер. Штаммы Д1 и Д2 являются наименее урожайными. На основании изученных свойств дикорастущих штаммов рекомендуем к внедрению в практическое грибоводство штаммы Академический и Волжский как перспективные.

Литература

- Методы экспериментальной микологии. Киев, 1982, 550 с.
- Гарибова Л.В., Барсукова Т.Н., Иванов А.И., Иманкулов М.О. Виды вешенок, перспективные для промышленного культивирования // Биол. науки. 1992. Вып. 3, С. 109 – 115.
- Лекомцева С.Н., Чайка М.Н., Инсарова И.Д., Гарибова Л.В. Характеристика некоторых видов и штаммов грибов из рода *Pleurotus* // Наука и практика грибоводства: Материалы IV Междунар. конф. Москва, 1997. С. 57 – 60.

Бухало А.С., Загордонцев О.А., Шашек В. Исследование культур высших базидиальных грибов в сканирующем электронном микроскопе. I. Пряжки. // Микология и фитопатология. 1985. Т.19. Вып. 3. С. 199 – 202.

Бухало А.С., Митропольская Н.Ю., Качуровская В.П., Косман Е.Г. Биологические особенности вешенки обыкновенной *P. ostreatus* (Fr.) Kumm. При длительном культивировании // Микология и фитопатология. 1988. Т. 22. Вып. 5. С. 385 – 388.

Иванов А.И., Гарибова Л.В. Методика оценки урожайности новых штаммов *P. ostreatus* (Jaca.: Fr.) Kumm. // Микология и фитопатология. 1989. Т. 23. Вып. 5. С. 485 – 487.

УДК 582.284

ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИЦЕЛИЯ *LENTINUS EDODES* НА РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

В.Е.Никитина, Р.А.Озерова*, О.М.Цивилева

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

** Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова*

С древних времен *Lentinus edodes*, или шиитаке, или черный лесной гриб считают эликсиром жизни. В естественных условиях он встречается только в лесах Дальнего Востока, Японии, Китая, Кореи и на Филиппинах, и уже более двух тысяч лет используется в пищу и для лечебных целей. В последнее время интерес к шиитаке резко возрос, что связано с его поистине уникальными целебными свойствами.

В мировом производстве грибов *L. edodes* занимает второе место после шампиньонов. В России культивирование шиитаке только начинается. Процесс получения плодовых тел в искусственных условиях состоит из двух этапов. На первом этапе выращивают мицелий сначала на различных плотных и жидких средах, а затем на зерне, на втором - получают плодовые тела грибов на древесных обрезках или на опилках лиственных пород деревьев. Для наиболее успешного внедрения данной культуры в практическое грибоводство необходимо провести подбор наиболее подходящих для каждого штамма питательных сред на всех этапах его производства.

Целью настоящей работы было изучение мицелиального роста *L. edodes* на минеральных и органических средах. Объектом исследования служили штаммы *L. edodes* 2Т, F-249, NY и 0779 из коллекции высших базидиальных грибов ИБФРМ РАН (г. Саратов). В эксперименте использовали минеральную среду Планкетта и 5 вариантов органических сред: мелассу, солодовый экстракт, пивное сусло, пшеничную муку, муку с дубовым отваром.

Оценку роста культуры на плотной среде проводили по ростовому коэффициенту, на жидких средах – по накоплению биомассы (Бисько и др., 1983; Бухало, 1988; Александрова и др., 1998; Методы ..., 1982)). Результаты учитывали через день, начиная с 5-го дня при культивировании на плотной среде и с 1-го дня – на жидких средах.