УДК 57.083.1

# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИЦЕЛИЯ И ПЛОДОНОШЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ СЪЕДОБНОГО КСИЛОТРОФНОГО БАЗИДИОМИЦЕТА *LENTINUS EDODES*

© 2007 Е.П. Ветчинкина, В.Е. Никитина

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов

Были исследованы отличия в вегетативном росте и образовании плодовых тел 10 штаммов ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* (шиитаке): F-249, 2-T, 0779, 4080, 84-siit, 58-siit, M-370, Ny, Ner и Poot. Изучены морфолого-культуральные признаки и ростовые характеристики мицелия, а также сроки плодоношения и урожайность вышеперечисленных штаммов. Полученные результаты дают возможность использования данных сведений в практике грибоводства.

Ксилотрофные базидиомицеты занимают важное место в структуре растительных и лесных биоценозов. Внимание многих ученых направлено на изучение биологии и культивирования высших базидиомицетов в связи с возможностью их использования в биодеструкции растительных отходов и получения в конечном результате качественного белка, ферментов, витаминов и уникального комплекса биологически активных и лекарственных веществ [7, 8, 10]. Кроме того, многие высшие базидиомицеты традиционно являются ценным питательным продуктом, который по своей органолептической специфичности не имеет аналогов или заменителей.

Проблема увеличения производства съедобных грибов не теряет своей актуальности в силу повышенного спроса на этот продукт на пищевом и фармацевтическом рынках. Объемы промышленного культивирования грибов в России, в целом, незначительны. Рентабельность небольших грибоводческих хозяйств, которыми представлено культивирование грибов в России, зачастую невелика. Одна из главных причин этого заключается в биологии грибов-базидиомицетов, предъявляющей особые требования к уровню организации производства. Важным этапом для налаживания культивирования грибов является определение морфолого-культуральных признаков и ростовых параметров мицелия, а также сроков плодоношения и

урожайности этих грибов.

Дереворазрушающий гриб *Lentinus edodes* (шиитаке) является в этом плане одним из наиболее перспективных объектов для изучения и дальнейшего его использования, поскольку отличается большой пищевой ценностью и вкусовыми качествами плодовых тел и, кроме того, наличием уникального комплекса биологически активных веществ, используемых для создания лечебно-профилактических и медицинских препаратов [2, 5, 11, 12]. Исследование скорости роста вегетативного мицелия и особенностей плодоношения является необходимым для определения не только фенотипических различий между штаммами L. edodes, но и для выявления новых высокопродуктивных штаммов, что является на сегодня актуальным вопросом в связи с отсутствием широкого промышленного культивирования шиитаке в России.

Это определило цель настоящей работы: изучение морфолого-культуральных признаков и ростовых характеристик мицелия, а также сроков плодоношения и урожайности некоторых штаммов съедобного ксилотрофного базидиомицета *L. edodes*.

#### Методика и материалы

**Объекты исследования.** В работе использовали 10 штаммов ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] (шиитаке): F-249, 2-T, 0779, 4080, 84-siit, 58-siit, M-370,

NY, Ner, Poot, полученных из коллекции высших базидиальных грибов кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета. Культуры грибов поддерживали на сусло-агаре при 4°C.

Поверхностное культивирование. Твердофазное культивирование L. edodes на чашках Петри осуществлялось на агаризованном пивном сусле (4° по Баллингу) [6] с добавлением нефильтрованного экстракта из дубовых опилок, при 26°C, как оптимальной температуре роста мицелия для данного вида [13]. Экстракт получали следующим способом: сухие дубовые опилки заливали водой (t = 100°C) и оставляли на ночь при комнатной температуре, автоклавировали 30 мин. при 0,5 атмосфер, 10% экстракт добавляли в среду культивирования.

В качестве инокулята использовали 14-суточную культуру  $L.\ edodes$ , выращенную аналогичным способом.

Интенсивный способ культивирования. При интенсивном способе культивирования шиитаке выращивали на древесном субстрате в лабораторных условиях. Субстрат готовили следующим способом: четыре части дубовых опилок смешивали с одной частью зерна пшеницы, запаривали на несколько часов горячей водой и слегка подсушивали (влажность субстрата - 70-90%). Затем им наполняли полиэтиленовые мешки емкостью 3 кг и автоклавировали 30 мин. при 1 атмосфере. В стерильных условиях, в проделанное сквозь всю толщу мешка отверстие, вносили зерновую грибницу в количестве 4-5% от веса субстрата. Отверстие закрывали ватной пробкой. При температуре 26°C в темноте блок зарастает грибницей в течение 30-60 дней. После этого мешок снимали, и блок помещали в светлое вентилируемое помещение с влажностью воздуха 85-90% и температурой около 20-26°C [4].

**Определение ростового коэффициента.** Ростовой коэффициент (РК) вычисляли по формуле:

### $PK = d \cdot h \cdot q/t$

где  $\mathbf{d}$  — диаметр колонии, мм;  $\mathbf{h}$  — высота колонии, мм;  $\mathbf{q}$  — плотность колонии, баллы;  $\mathbf{t}$  — возраст колонии, сут. Исследование ростовых

и культурально-морфологических характеристик мицелиальных колоний проводили согласно методике, описанной в книге «Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре» [3].

**Определение урожайности грибов.** Урожайность разных штаммов шиитаке выражали как процентное отношение сырой биомассы плодовых тел от массы субстрата.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили общепринятым методом с использованием t-критерия Стьюдента-Фишера [9].

#### Результаты и их обсуждение

Анализ проведенных исследований показал, что интенсивность роста мицелиальных колоний *L. edodes* у штаммов F-249 и Ner была максимальной, наименьший ростовой показатель наблюдался у штаммов 58 siit и 84 siit (табл. 1). Следует обратить внимание на значение ростового коэффициента на 5-7 сутки культивирования. Для большинства исследуемых штаммов в этот период РК был наивысшим. Следует отметить, что мицелий данных штаммов шиитаке стелящийся паутинистый и высота колоний не превышает 1 мм.

Плотность колоний оценивали по 3- балльной шкале, уплотнение мицелия происходит у разных штаммов на 6-9 сутки культивирования. Наиболее плотным мицелий становится через 3-4 недели выращивания, поэтому в данном эксперименте плотность колоний оценивается в 1 и 2 балла.

Согласно классификации А.С. Бухало [3], по скорости роста мицелиальные колонии базидиальных грибов делят на три группы: І — быстрорастущие PK > 100), II — растущие со средней скоростью (PK = 50-100), III — медленнорастущие (PK < 50). Данные таблицы свидетельствуют, что все исследуемые штаммы L. edodes имели ростовой коэффициент меньше 50, поэтому они относятся к группе медленнорастущих мицелиальных колоний.

Таким образом, анализ культурально-морфологических особенностей мицелиальных колоний исследуемых штаммов *L. edodes*, показал, что все штаммы относятся к группе медленнорастущих базидиальных грибов, их

L. edodes, штаммы	Время культивирования, сутки									
	Белый паутиновидный мицелий	Белый плотный мицелий	Белые плотные бляшки на мицелии	Пигменти- рованный мицелий	Коричневая мицелиальная пленка	Примордии	Плодовые тела			
F-249	15	27	31	38	41	50	53			
2-T	21	32	36	49	54	59	63			
M-370	25	34	40	52	58	65	69			
Ner	17	28	36	40	43	49	57			
Poot	19	30	37	38	44	51	58			
NY	25	40	48	58	65	-	-			
4080	22	30	42	49	62	68	75			
0779	20	29	39	46	64	74	79			
58 siit	29	35	45	49	54	60	67			
84 siit	30	35	49	53	61	-	-			

**Таблица 1.** Ростовой коэффициент мицелиальных колоний штаммов гриба *L. edodes* при твердофазном культивировании

мицелий белый паутинистый, стелящийся по субстрату. Полное зарастание питательной среды чашек Петри происходило в среднем за 10 суток. Уплотнение мицелия происходит на 6-9 сутки культивирования, но наиболее плотный ватно-войлочный мицелий образуется спустя месяц от момента засева.

Установлено, что максимальное значение ростового коэффициента всех штаммов приходилось на 5-7 сутки культивирования. Наибольший ростовой показатель наблюдался у штамма F-249, наименьший - у 84 siit.

Нами были также исследованы отличия в вегетативном росте и образовании плодовых тел *L. edodes* на комплексной растительной среде, основным компонентом которой являются опилки дуба, природного субстрата, на котором чаще всего встречается шиитаке в естественных условиях, с расчетом выявления высокопродуктивных штаммов.

В результате проведенных исследований нам удалось определить фенотипические отличия между штаммами *L. edodes*, которые проявлялись в способности к колонизации субстрата, времени образования различных вегетативных структур и плодовых тел, общего урожая.

В таблице 2 приведены сроки появления морфообразований у разных штаммов L. edodes, характерных для данного вида грибов. Из таблицы видно, что наиболее короткий срок плодоношения наблюдался у штамма F-

249, а самый длинный, с момента инокуляции и до образования первых плодовых тел, - у штамма 0779. Однако не у всех штаммов мы наблюдали полный цикл развития. Отдельные штаммы, NY и 84 siit, оказались неспособными образовывать плодовые тела при данных условиях культивирования. Это может быть объяснено несовместимостью некоторых штаммов с субстратом, что проявляется в неспособности мицелия переходить на питательную среду, что в свою очередь может говорить о некоторых различия в ферментативном комплексе между штаммами. Однако не исключено, что эти штаммы являются физиологически «неполноценными». Другие штаммы образовывали плодовые тела на субстрате с опилками и имели между собой морфологические отличия, которые можно видеть на рис. 1.

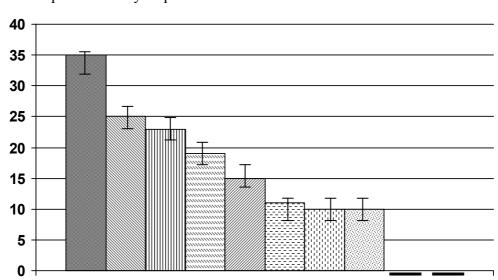
Образование коричневой мицелиальной пленки – бархатистого коричневого мицелия, представляющего собой сплетение толстых пигментированных гиф [1], характерно для культур всех исследуемых штаммов *L. edodes*. Появление этой структуры предшествует плодоношению. Однако у штамма 2Т имеется некоторая особенность: после колонизации субстрата и уплотнения непигментированного мицелия гриб «выбрасывает» гипертрофированные бесформенные примордии и нормального плодоношения не происходит. Спустя некоторое время начинается образование



**Рис. 1.** Плодовые тела разных штаммов *L. edodes* 

коричневой мицелиальной пленки, после чего образуются нормальные примордии и плодовые тела. Эта морфогенетическая особенность отличает данный штамм от других и косвенным образом подтверждает тот факт, что без предварительного образования коричневой мицелиальной пленки, нормального плодоношения не происходит.

Плодоношение продолжается 8-16 недель, грибы появляются через каждые 2-3 недели. Урожайность за период плодоношения у разных штаммов составляла от 10% до 25% от сырой массы субстрата (рис. 2). Максимальный урожай плодовых тел был зафиксирован при плодоношении штамма F-249 и составил 35%.



% сырой массы плодовых тел от сырой массы субстрата

F-249, 2-T, Ner, Poot, 58-siit, 0779, 4080, M-370, NY, 84-siit

**Рис. 2.** Урожайность разных штаммов *L. edodes* 

**Таблица 2.** Образование различных вегетативных структур у штаммов гриба *L. edodes* при твердофазном культивировании

	Время культивирования, сутки								
L. edodes, штаммы	Белый паутиновидны й мицелий	Белый плотный мицелий	Белые плотные бляшки на мицелии	Пигменти- рованный мицелий	Коричневая мицелиальная пленка	Примордии	Плодовые тела		
F-249	15	27	31	38	41	50	53		
2-T	21	32	36	49	54	59	63		
M-370	25	34	40	52	58	65	69		
Ner	17	28	36	40	43	49	57		
Poot	19	30	37	38	44	51	58		
NY	25	40	48	58	65	-	-		
4080	22	30	42	49	62	68	75		
0779	20	29	39	46	64	74	79		
58 siit	29	35	45	49	54	60	67		
84 siit	30	35	49	53	61	-	-		

Таким образом, полученные в ходе работы результаты исследований показывают не только фенотипические отличия между штаммами  $L.\ edodes$ , но и дают возможность отобрать наиболее перспективные штаммы в

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Е.А., Завьялова Л.А., Терешина В.М., Гарибова Л.В., Феофилова Е.П. По-

плане плодоношения для внедрения их в производство.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 06-04-81042 Бел а).

лучение плодовых тел и глубинного мицелия *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]//Микробиология. 1998. Т. 67,  $\mathbb{N}$  5.

- 2. *Ву Т.* Благоприятные лечебные эффекты экзотических съедобных грибов // Бюл. МАГ. 1996.
- 3. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. 1983.
- 4. *Гарибова Л.В.* Японский гриб шиитаке // Наука и жизнь. 2003. № 4.
- 5. Гарибова Л.В., Завьялова Л.А., Александрова Е.А., Никитина В.Е. Биология Lentinus edodes (шиитаке). Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические особенности // Микология и фитопатология. 1999. Т. 33. № 2.
- 6. Методы экспериментальной микологии / Ред. В.И. Билай. Киев: Наук. думка, 1982.
- 7. *Низковская О.П.* Противоопухолевые свойства высших базидиомицетов. // Микология и фитопатология. 1983. Т. 17, № 3.
- 8. Решетникова И.А. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. Накопление

- селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами. М.: Новинтех-Пресс, 1997
- 9. *Рокицкий П.Ф.* Биологическая статистика. Минск: Вышейш. шк. 1973.
- 10. Феофилова Е.П. Современные направления в изучении биологически активных веществ базидиальных грибов // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34, № 6.
- 11. *Bender S., Lonergan G. T., Backhaus J. et al.* The antibiotic activity of the edible and medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. // Intern. J. Medicinal Mushrooms. 2001. V. 3, № 2-3.
- 12. *Konno K*. Biologically active components of poisonous mushrooms // Food Rev. Intern. 1995. V. 11, № 1.
- 13. *Przybylowicz P., Donoghue J.* Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation. Chapter 3. Physical and chemical factors/Dubuque: Kendall/Hunt Publ. Co., 1991.

## MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF MYCELIAL GROWTH AND FRUITING IN CERTAIN STRAINS OF THE EDIBLE XYLOTROPHIC BASIDIOMYCETE LENTINUS EDODES

© 2007 E.P. Vetchinkina, V.E. Nikitina

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences, Saratov

This work was undertaken to examine differences in vegetative growth and fruit-body formation in 10 strains of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes* (shiitake), namely F-249, 2-T, 0779, 4080, 84-siit, 58-siit, M-370, Ny, Ner, and Poot. The morphological, cultural, and growth characteristics of the mycelium, the fruiting times, and the productivity of the above strains were studied. The obtained results make it possible to use the data from this study in mushroom-growing practice.