

Криоконсервирование мицелия вешенки *Pleurotus ostreatus* разных штаммов по трем программам замораживания

UDC 57.043:582.284.063.8

L.G. CHERNYSHENKO*, L.E. SHATILOVA, L.V. STEPANYUK

Cryopreservation of *Pleurotus* Mycelium *Pleurotus ostreatus* of Different Strains According to Three Freezing Programs

Исследовали морфофункциональные свойства мицелия вешенки *Pleurotus ostreatus* разных штаммов после криоконсервирования по трем программам замораживания. Оптимальной для криоконсервирования была признана программа 1: охлаждение со скоростью 1–4°C/мин до –28°C, стабилизация 20 мин, продолжение охлаждения до –100°C со скоростью 30°C/мин, быстрое погружение в жидкий азот. Установлено, что жизнеспособность криоконсервированного по разным программам мицелия не изменялась.

Ключевые слова: криоконсервирование, мицелий, штаммы, *Pleurotus ostreatus*.

Досліджували морфофункціональні властивості міцелію вешенки *Pleurotus ostreatus* різних штамів після криоконсервування за трьома програмами заморожування. Оптимальною для криоконсервування була визнана програма 1: охолодження зі швидкістю 1–4°C/хв до –28°C, стабілізація 20 хв, продовження охолодження до –100°C зі швидкістю 30°C/хв, швидке занурення в рідкий азот. Встановлено, що життєздатність криоконсервованого за різними програмами міцелію не змінювалась.

Ключові слова: криоконсервування, міцелій, штами, *Pleurotus ostreatus*.

Morphofunctional properties of *pleurotus* mycelium *Pleurotus ostreatus* of different strains after cryopreservation according to three freezing programs were investigated. The cryopreservation program 1 was found as optimal cooling at the rate of 1–4°C/min down to –28°C/min, 20 min stabilization, further cooling down to –100°C at a rate of 30°C/min, fast submerging into liquid nitrogen. The viability of cryopreserved mycelium on different programs was established as not changed.

Key-words: cryopreservation, mycelium, strain, *Pleurotus ostreatus*.

В настоящее время в связи с увеличением дефицита протеинов перед человечеством возникла проблема расширения природных и искусственных их источников. Поэтому в культуру вводят новые белоксодержащие виды микроорганизмов, животных, растений, среди которых одними из самых ценных являются съедобные грибы. Культивирование съедобных грибов можно проводить в течение всего года на субстратах, которые являются отходами лесной промышленности (опилки), сельского хозяйства (шелуха семечек, солома, отруби и т.д.). При этом субстрат после сбора урожая грибов становится ценным источником перегноя для садоводства и овощеводства.

Повышение спроса на грибы способствует дальнейшему изучению их биологии, в результате чего совершенствуются методы выращивания культуры, выведение новых высокопродуктивных штаммов. Однако традиционные методы поддержания культуры приводят к постепенному изменению исходных свойств штамма и в дальнейшем – к их утрате. Потери также происходят из-за заражения культуры.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

В настоящее время основным методом сохранения мицелия с неизменными исходными свойствами, высокой жизнеспособностью и продуктивностью является криоконсервирование.

Мицелий чаще всего замораживают прямым погружением в азот [6,7], иногда, особенно при криоконсервировании культур на жидких средах, используют криопротекторы [8].

Цель работы – сравнение морфофункциональных свойств мицелия разных штаммов *Pleurotus ostreatus* после криоконсервирования по разным программам.

Материалы и методы

Зерновой мицелий получали путем пересева мицелия, выросшего на чашках Петри на сусло-агаровой среде, на свежее стерильное зерно пшеницы. Культивирование проводили во флаконах объемом 250 мл в термостате при 25°C [2, 3].

Зерновой мицелий на стадии 8-дневного роста стерильно помещали в 10 мл контейнеры из фторопластовой пленки и запаивали. Криоконсервирование проводили на программном замораживателе УКБ-1

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

(установка криоконсервирования биоматериалов) производства СКТБ с ОП при ИПКиК НАН Украины по программам: программа 1 – охлаждение со скоростью 1–4°C/мин до –28°C, стабилизация 20 мин, продолжение охлаждения до –100°C со скоростью 30°C/мин, быстрое погружение в жидкий азот; программа 2 – охлаждение со скоростью 30–40°C/мин до –28°C, стабилизация 15 мин, быстрое погружение в жидкий азот; программа 3 – быстрое погружение в жидкий азот (400°C/мин).

Замороженные образцы отогревали на водяной бане при температуре 39–41°C.

Контролем служил 8-дневный зерновой мицелий.

Для исследований мы выбрали часто используемые в современном производстве штаммы вешенки *P. ostreatus*: Дон-103 (Д-103) и НК-35 – зимние, Мичиган – летний.

Размороженный и контрольный зерновой мицелий пересевали на чашки Петри со средой на основе 2%-го агара на 10%-м отваре пшеницы и 10%-м отваре овса с добавкой солодового суслу в конечной концентрации 2% СВ. В центр каждой чашки Петри помещали одно зерно. Температура культивирования 25°C.

Сохранность мицелия определяли по наличию его роста на сусло-агаровой среде визуально. Скорость роста мицелия подсчитывали по площади его зарастания на сусло-агаровой среде каждые сутки в течение 9–11 суток культивирования до полного зарастания чашки мицелием:

$$F = \frac{\pi ab}{4 (\text{площадь эллипса})},$$

где *a* и *b* – наибольший и наименьший диаметры зарастания мицелия в чашке Петри.

Кроме того, оценивали культуральные и морфологические свойства мицелия (количество кругов роста, высота мицелия, цвет, плотность мицелия в каждом круге роста). Морфологическое строение гифов определяли под микроскопом ×100.

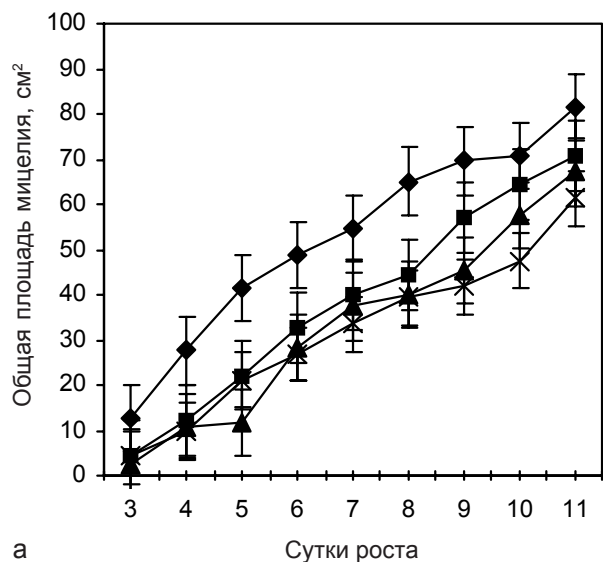
Статистический анализ результатов проведен по методу Стьюдента-Фишера. Различия данных считали достоверными при $p < 0,05$ [1, 4, 5].

Результаты и обсуждение

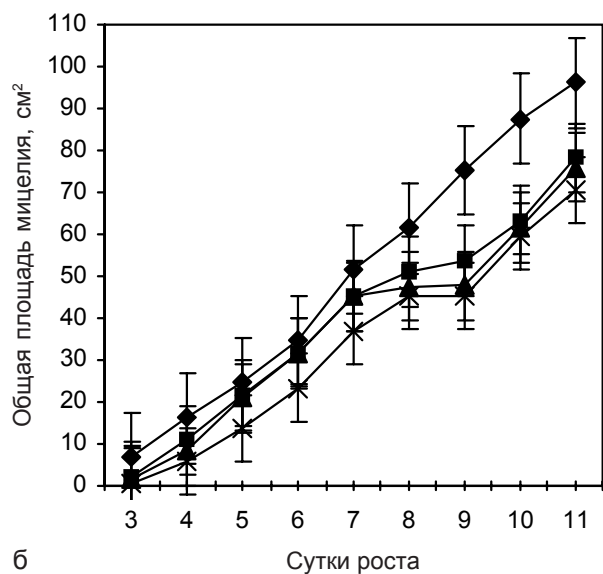
Проведенные исследования показали, что при криоконсервировании по всем исследованным программам жизнеспособность мицелия по сравнению с контролем не уменьшалась.

Однако для всех программ криоконсервирования скорость роста мицелия достоверно снижалась.

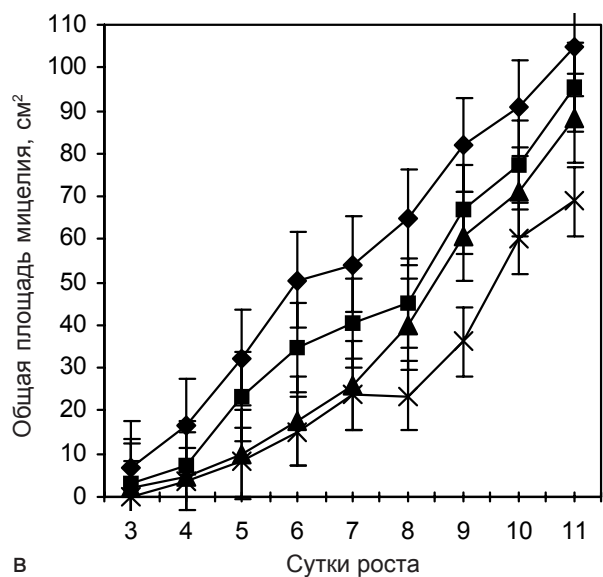
Для исследованных штаммов мицелия вешенки наиболее травматичной программой криоконсервирования была программа 3 (прямое погружение



а



б



в

Рост зернового мицелия вешенки *P. ostreatus* разных штаммов (а – Д-103; б – НК-35; в – Мичиган) при разных программах криоконсервирования. ♦ – контроль; ■ – программа 1; ▲ – программа 2; × – программа 3.

Таблица 1. Характеристики криоконсервированного зернового мицелия вешенки *P. Ostreatus* разных штаммов в зависимости от программ криоконсервирования на 4-е сутки роста

Штамм	Условия эксперимента	Количество круговроста, шт	Высота мицелия, мм	Характеристики мицелия
Д-103	Интактный контроль	2	9±1,15	Белый, густой, пушистый, радиальный
	Криоконсервирование по программе 1	2	8	Белый, густой, пушистый, радиальный
	Криоконсервирование по программе 2	2	8	Белый, достоверно менее густой, пушистый, радиальный
	Криоконсервирование по программе 3	2	8	Белый, достоверно менее густой, пушистый, радиальный
НК 35	Интактный контроль	2	8,67± 2,3	Белый, густой, пушистый, радиальный
	Криоконсервирование по программе 1	1-2	7,8±1,92	Белый, густой, пушистый, радиальный
	Криоконсервирование по программе 2	1-2	7±1	Белый, достоверно менее густой, пушистый, радиальный
	Криоконсервирование по программе 3	1	5±1	Белый, достоверно менее густой, пушистый, радиальный
Мичиган	Интактный контроль	3	9,38±0,92	Белый, густой, пушистый, радиальный
	Криоконсервирование по программе 1	2	9,30±0,95	Белый, густой, пушистый, радиальный
	Криоконсервирование по программе 2	1-2	9,4±1,26	Белый, достоверно менее густой, пушистый, радиальный
	Криоконсервирование по программе 3	1-2	7±3,6	Белый, достоверно менее густой, пушистый, радиальный

Таблица 2. Количество кругов роста мицелия после криоконсервирования по разным программам в процессе роста

Штамм	Программа	Сроки роста, сутки								
		3	4	5	6	7	8	9	10	11
НК-35	Контроль	2	2-3	2-3	3-4	3-6	4-6	4-6	4-6	4-6
	1	1-2	1-3	2-3	3	4-5	4	4-5	4-6	4-6
	2	1	1-2	3	3-4	4-5	4-5	5	4-6	4-6
	3	1	1-2	2	3	3-4	3-4	4-5	4-5	4-6
Мичиган	Контроль	2	3	4	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6
	1	1	2	3	3	3	4-5	5-6	5-6	5-6
	2	1	1-2	1-2	2-3	4	4-5	5	5-6	5-6
	3	1	1-2	2	2-3	2-3	4	4	4-5	4-5
Д-103	Контроль	2	2	3-4	5	5	5-6	5-6	5-6	5-6
	1	1-2	2	3	4-5	4-5	4-5	5-6	5-6	5-6
	2	1-2	2	3	4	4	4-5	4-5	4-5	4-5
	3	1-2	2	2-3	3	3-4	3-4	4-5	4-5	4-5

в жидкий азот). Стабилизация при -28°C уменьшает криповреждение и приводит к увеличению скорости роста мицелия при использовании программ 1 и 2, а снижение скорости охлаждения до $1-4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (программа 1) обеспечивает наиболее высокие показатели скорости роста мицелия (рисунок).

При этом жизнеспособность мицелия достоверно не уменьшалась по сравнению с контролем, а скорость роста мицелия снижалась, что приводило к более позднему заростанию чашек в опыте по сравнению с контролем, незначительно уменьшались максимальная высота мицелия, плотность, количество кругов роста в первые 8 суток культивирования, однако в дальнейшем эти показатели приближались к контрольным (табл. 1, 2).

Морфологические характеристики гифов мицелия при изучении под микроскопом не отличались в контроле и после криоконсервирования.

Выводы

Криоконсервирование зернового мицелия по медленной программе замораживания с последующим быстрым отогревом при $37-41^{\circ}\text{C}$ можно рекомендовать как режим, наименее влияющий на скорость последующего роста мицелия высших грибов в первом пассаже.

Литература

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.— Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962.— 180 с.
2. Дудка М.П. Промышленное выращивание высших грибов.— Киев: Наук. думка, 1998.— 575 с.
3. Дудка М.П. Производство и хранение посевного мицелия съедобных грибов: Метод. рекомендации.— Киев: Гос. ун-т, 1997.— 17 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия.— М.: Высш. шк., 1980.— 293 с.
5. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посібник.— Донецьк, 1999.— 210 с.
6. Lara-Herrera I., Mata G., Gaitan-Hernandez R. Evaluation of the viability of *Pleurotus* ssp. strains after liquid nitrogen cryopreservation // Rev. Microbiol. (Online).— 1998.— Vol. 29, N 3.
7. Lara-Herrera I., Mata G., Gaitan-Hernandez R. Evaluation of the effect of cryopreservation of *Pleurotus* strains on carpophore production // Rev. Iberoam. Micol.— 1998.— Vol. 15, N1.— P. 44–47.
8. Singh S.K., Upadhyay R.C., Kamal S., Tiwari M. Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability // Cryo-Letters.— 2004.— Vol. 25, N1.— P. 23–32.

Поступила 01.07.2008