

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Комиссаров Никита Сергеевич

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ МАКРОМИЦЕТОВ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУР

Специальность 1.5.18 Микология

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

Гарибова Лидия Васильевна

Доктор биологических наук, профессор

Сидорова Ирина Ивановна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Хранение на агаризованных средах.	13
1.2 Хранение в сублимированном состоянии.	16
1.3 Хранение при отрицательных температурах.	17
1.3.1 Температура.....	18
1.3.2 Криопротекторные соединения.	21
1.3.3 Использование субстратов-носителей.	26
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	30
2.1 Формирование коллекции чистых культур макромицетов	30
2.1.1 Места сбора плодовых тел	30
2.1.2 Изоляция чистых культур макромицетов.....	31
2.1.3 Видовая идентификация макромицетов	32
2.1.4 Базовая коллекция штаммов макромицетов	33
2.1.5 Рабочая коллекция штаммов макромицетов	35
2.2 Методы хранения штаммов коллекции	40
2.3 Морфолого-культуральные характеристики исследуемых штаммов....	44
2.4 Физиологические характеристики исследуемых штаммов	45
2.5 Эндоглиуканазная активность штаммов макромицетов	46
2.6 Статистическая обработка данных.....	48
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	49
3.1 Жизнеспособность штаммов при использованных методах хранения .	49
3.2 Морфолого-культуральные характеристики штаммов	52
3.2.1 Хранение на агаризованных средах	56
3.2.2 Хранение в сублимированном состоянии	57
3.2.3 Криохранение. Метод «агаровых блоков»	58
3.2.4 Криохранение. «Перлитовый протокол»	59
3.2.5 Криохранение. «Зерновой протокол»	60
3.3 Физиологические характеристики штаммов.....	62
3.3.1 Серийные пересевы.....	62
3.3.2 Хранение под слоем дистиллированной воды	64

3.3.3 Хранение в сублимированном состоянии	67
3.3.4 Криохранение. Протокол с использованием «агаровых блоков» ...	67
3.3.5 Криохранение. «Перлитовый протокол»	70
3.3.6 Криохранение. «Зерновой протокол»	73
3.4 Эндоглиюканазная активность штаммов.....	76
3.4.1 Хранение на агаризованных средах	77
3.4.2 Криохранение.	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
ВЫВОДЫ	83
БЛАГОДАРНОСТИ	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	85
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Фотографии плодовых тел макромицетов.....	116
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Коллекция штаммов макромицетов.	122
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Таблицы.....	127
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Изменение типа колонии <i>Pleurotus ostreatus</i>	130
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Фотографии колоний макромицетов.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Макромицеты — представители группы грибов, формирующие плодовые тела (спорокарпы), которые можно различить невооруженным глазом, а также дать их первичное описание, не используя оптические инструменты. Это сборная группа, включающая в себя представителей отделов Ascomycota и Basidiomycota (Wessels, 1993; Lodge et al., 2004; Mueller et al., 2007).

Плодовые тела макромицетов являются богатым источником микро- и макроэлементов, протеинов и углеводов при низком содержании жиров, с чем связано их широкое применение в пищевой промышленности (Ahlawat et al., 2016; Vetter, 2019). Спорокарпы культивируемых макромицетов богаты минеральными соединениями, в частности, калием, фосфором, железом, цинком, медью и селеном. В плодовых телах макромицетов отмечают высокое содержание витамина B₁, рибофлавина (витамин B₂), ниацина (витамин PP) и производных фолиевой кислоты, находящееся на уровне свежих овощей, яиц и сыра (Mattila et al., 2001; Furlani, Godoy, 2008). Содержание микроэлементов в спорокарпах промышленно выращиваемых макромицетов сильно отличается, в зависимости от видовой принадлежности. Так, концентрация селена в плодовых телах *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. и *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler ниже в 20 и 80 раз, соответственно, чем у *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach, при более высоком содержании цинка (Furlani, Godoy, 2008).

К наиболее изученным макромицетам относят промышленно культивируемые виды. На сегодняшний день, к самым распространённым видам культивируемых макромицетов, составляющим 82 % от общего объема выращенных плодовых тел, относят: *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quél., *Cyclocybe cylindracea* (DC.) Vizzini & Angelini, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél., *P. ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer (Chang, 1999; Rai, 2004;

Vetter, 2019). По данным Продовольственной и Сельскохозяйственной Организации ООН на август 2019 года, объем мирового производства плодовых тел макромицетов составил 20,85 млн метрических тонн. Лидером в культивировании макромицетов является Китай (Rai, 2004; Atila, 2017), в 2019 году производивший 86 % от общего объема выращенных грибов в мире (FAO, 2019).

Макромицеты обладают значительным потенциалом для использования в фармацевтической промышленности, производстве активных соединений, применяемых в лечебной практике. Например, плодовые тела штаммов вида *Agaricus bisporus* являются источником незаменимых, условно незаменимых и заменимых аминокислот, в частности, аргинина, используемого в ряде пищевых добавок, применяемых в рационе больных онкологическими заболеваниями (Kalač, 2012; Muszyńska et al., 2017; Jahani et al., 2018). Аминокислотный состав белков *A. bisporus* сравним с животными белками, что, предположительно, позволит снизить потребление мясных продуктов в рационе (Atila et al., 2017). Помимо высокого содержания аминокислот, плодовые тела *A. bisporus* аккумулируют галактоманнан, α -глюкан и β -глюкан, которые обладают иммуностимулирующим и противоопухолевым действием. Отмечается высокое содержание фенольных соединений, в частности, токоферольной группы (в совокупности – витамин E), для которых показан антиоксидантный эффект. Помимо токоферолов, спорокарпы шампиньона двуспорового формируют такие соединения как галловая кислота, протокатеховая кислота, мирицетин, обладающие сильным антиоксидантным действием (Liu et al., 2013; Semwal et al., 2016; Gąsecka et al., 2018; Jiang et al., 2019). Иммуномодулирующий эффект экстрактов из плодовых тел *Ganoderma lucidum* обуславливается стимулированием Т-клеток, NK-клеток и макрофагов (Pillai et al., 2008; Sanodiya et al., 2009; Smina et al., 2016). Продуцируемые активные соединения обладают иммуномодулирующим, противоопухолевым, радиопротекторным, антидиабетическим и

гепатопротекторным действием (Zhao et al., 2010; Ma et al., 2015; González et al., 2020; Hu et al., 2020). Полисахариды *G. lucidum* обладают противораковым действием, сдерживая развитие саркомы 180 (Wasser, Weis, 1999; Liu et al., 2002). Спектр аккумулируемых тритерпеноидных соединений показал цитотоксичность по отношению к раковым клеткам, сдерживая их пролиферацию и вызывая апоптоз (Li et al., 2005; Tang et al., 2006; Xia et al., 2020). Герицерон, еринакол и еринацин, соединения, продуцируемые *Hericium erinaceus*, обладают иммуномодулирующим, антиоксидантным, противовоспалительным и гипогликемическим действием, оказывающие тонизирующее влияние на центральную нервную систему, снижая общую утомляемость организма (Wang et al., 2004; Wang et al., 2005; Nagano et al., 2010; Liu et al., 2015; Li et al., 2018). Для видов *H. americanum* Ginns и *H. coralloides* (Scop.) Pers. также показано образование фенольных соединений, обладающих антиоксидантным действием (Kim et al., 2018; Atila, 2019). Виды рода *Pleurotus* известны как продуценты соединений, обладающих антибиотической, иммуномодуляторной, противоопухолевой, антиоксидантной, противовоспалительной и антивирусной активностью (Gregori et al., 2007; Yang et al., 2013; Ma et al., 2014). Экстракты плодовых тел *P. ostreatus* и *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. обладают высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам PC-3 рака простаты, клеткам MCF-7 рака молочной железы, HT-29 рака кишечника, подавляя их пролиферацию путем нарушения клеточного цикла на стадии G0/G1, что приводит к раннему апоптозу (Khan, Tania, 2012; Patel et al., 2012; Deepalakshmi, Sankaran, 2014). На сегодняшний день, в медицинской практике применяют ряд препаратов, созданных на основе биоактивных соединений макромицетов, к которым относят лентинан, ганодерную кислоту, герицерон и др.

Помимо применения в различных отраслях биотехнологического производства, базидиальные макромицеты представляются перспективными для использования в мероприятиях по биоремедиации экосистем, для

которых характерно сильное антропогенное воздействие (Deshmukh et al., 2016). С наращиванием темпов химического производства и обработки нефтепродуктов целесообразным является изучение биоремедиационного потенциала макроскопических базидиомицетов в отношении широкого спектра ксенобиотиков, к которым относят различные алифатические и полициклические углеводороды, нефть и продукты ее переработки и др. Ксилосапротрофные базидиомицеты показали способность к деградации ряда полициклических соединений, синтетических красителей и пестицидов (Eggen, Majcherczyk, 1998; Purnomo et al., 2011; Balaes et al., 2013; Lladó et al., 2013; Rodríguez-Rodríguez et al., 2013; Rosales et al., 2013; Balaes et al., 2014). Помимо этого, отмечена способность разлагать различные алифатические углеводороды и полифенольные соединения (Marco-Urrea et al., 2006; Marco-Urrea et al., 2009; Ntougias et al., 2015; Young et al., 2015; Kulikova et al., 2016). Важную роль в деградации содержащихся в почве ксенобиотических соединений играет ассоциация ксилосапротрофных макромицетов с бактериальной микрофлорой (Baldrian, 2008b; Pozdnyakova et al., 2008; Zanaroli et al., 2010; Liu et al., 2017; Turkovskaya, Pozdnyakova, 2018).

Изучение аспектов физиологии, биохимии и морфологии макромицетов подразумевает наличие рабочих, поддерживаемых в жизнеспособном состоянии, коллекций штаммов чистых культур различных видов, которые должны не только оставаться жизнеспособными после длительных периодов хранения, но и сохранять репродуктивную способность, морфолого-культуральные и биохимические свойства (скорость роста, морфология, продукция метаболитов и т.д.) (Белова и др., 2005). Это относится не только к учебным и научным коллекциям, коллекциям на пищевых и биотехнологических производствах, но и к проектам по сохранению видов, находящихся под угрозой исчезновения. Использование макромицетов в хозяйственной деятельности представляет собой уникальный по своей структуре и сложности производственный комплекс, основой которого является поддерживаемая и регулярно обновляемая коллекция

штаммов чистых культур. На сегодняшний день, в коллекциях чистых культур с той или иной степенью успешности применяется широкий спектр методов хранения, включающий в себя группу протоколов хранения на агаризованных средах и в замороженном состоянии (Озерская, 2012). Используемые методы были изначально разработаны для видов микромицетов, способных к формированию покоящихся стадий, крайне устойчивых к неблагоприятным условиям хранения (замораживание, высушивание, длительные периоды покоя и т.д.) (Красильников, 1967; Castellani, 1963; Hwang, 1960). В связи с тем, что у большинства макромицетов в культуре не формируются структуры бесполого спороношения и на хранение помещается активно растущий мицелий, не обладающий соответствующими адаптациями к стрессовым условиям, стандартные протоколы часто бывают не оптимальными, что в значительной степени ограничивает спектр видов, которые могут успешно переживать хранение. В связи с этим, необходимым представляется оценка эффективности применяемых методов в сохранении жизнеспособности, физиологических и биохимических свойств штаммов, разработка новых протоколов хранения и адаптация имеющихся под новые группы видов (Smith, 1998; Nakasone et al., 2004; Singh et al., 2004a; Bisko et al., 2018; Linde et al., 2018).

Ввиду высокого биотехнологического и биоремедиационного потенциала макромицетов, селекции новых штаммов, создания современных производственных комплексов, необходимым является изучение влияния разных методов хранения на способность культур макромицетов сохранять свою жизнеспособность, формировать плодовые тела, продуцировать активные соединения в объемах, соответствующих значениям до помещения на хранение (Field et al., 1993; Reid, Paice, 1994; Sánchez, 2009; Albu et al., 2020).

Цель работы — сравнительное изучение влияния различных методов хранения чистых культур на комплекс морфолого-культуральных признаков и физиологические характеристики макромицетов.

Задачи:

1. Создание рабочей коллекции штаммов макромицетов различных эколого-трофических и таксономических групп;
2. Сравнительное изучение влияния различных методов хранения на жизнеспособность и морфолого-культуральные характеристики чистых культур макромицетов;
3. Исследование влияния различных криопротекторов в протоколах криохранения на морфолого-культуральные характеристики чистых культур макромицетов;
4. Оценка влияния использования субстратов-носителей в протоколах криохранения на морфолого-культуральные характеристики чистых культур макромицетов;
5. Изучение влияния различных методов хранения на эндоглиюканазную активность чистых культур макромицетов.

Объект исследования. Объектом исследования были штаммы базидиальных и сумчатых макромицетов из различных таксономических и эколого-трофических групп, выделенные на территории Российской Федерации.

Научная новизна. Впервые проведён анализ влияния различных методов хранения, субстрат-носителей и криопротекторов на морфологию и физиологию мицелия выбранных видов макромицетов. Впервые показано, что морфолого-культуральные и физиологические характеристики отобранных видов макромицетов, принадлежащих к разным эколого-трофическим группам, зависят от методов хранения, используемых криопротекторных соединений и субстрат-носителей. Выявлена связь между принадлежностью к эколого-трофическим группам и способностью штаммов сохранять физиологическую и биохимическую активность после периодов

хранения. Впервые было показано, что культуры *Auricularia auricula-judae*, *Flammulina rossica*, *Pleurotus ostreatus* способны сохранять свою жизнеспособность после хранения в сублимированном состоянии. Получены первые данные об эндогликаназной активности после периода хранения для 17 видов макромицетов. Впервые получены данные о морфолого-культуральных и физиологических характеристиках вида *Sarcosoma globosum*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Анализ полученных данных позволил определить влияние общепринятых в микологических исследованиях и модифицированных методов хранения на морфологию и физиологию культур, эндогликаназную активность штаммов макромицетов, не способных к формированию покоящихся стадий в культуре. Разработаны авторские модификации методов криохранения. Применяемые модификации протоколов криохранения и рекомендации по хранению чистых культур могут быть использованы в учебных, исследовательских и промышленных коллекциях штаммов.

По итогам работы значительно увеличена коллекция штаммов макромицетов кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ, являющаяся частью депозитария живых систем «Ноев ковчег» и включённая в электронную базу данных World Data Centre for Microorganisms. Ваучерные гербарные образцы плодовых тел переданы на хранение в гербарий Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН, г. Санкт-Петербург).

На основе материалов из коллекции макромицетов на кафедре микологии и альгологии проходят практические занятия по курсу «Биологические основы промышленного культивирования макромицетов в пищевых и медицинских целях». Разработаны рекомендации по хранению штаммов макромицетов.

Личный вклад автора. Личный вклад автора присутствует на каждом этапе выполнения диссертации и заключается в сборе и обработке

материалов (плодовые тела макромицетов), выделении чистых культур макромицетов, их идентификации (с использованием морфологических и молекулярно-генетическим методов), помещению на хранение различными методами, изучению морфолого-культуральных и физиологических характеристик штаммов, измерению эндоглюканазной активности, статистической обработке и обобщении результатов, написании статей и тезисов, представлении результатов работы на конференциях, поддержании и расширении коллекции чистых культур.

Методология и методы исследования. В работе использовали как классические, так и современные методы исследования. К первым относили методы изучения морфолого-культуральных и ростовых характеристик штаммов, ко вторым — спектрофотометрические методы исследования ферментативной активности.

Положения, выносимые на защиту.

1. Методы хранения чистых культур макромицетов видоспецифичны. Целесообразным является поиск оптимальных методов хранения для каждого отдельного вида.
2. Ксилосапротрофные макромицеты лучше сохраняют физиологическую активность в процессе хранения, в том числе и в сублимированном состоянии.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается выбором проверенных методов исследования, проведением экспериментов на современном оборудовании, большим объемом материала и публикацией научных статей в рецензируемых журналах.

Основные положения и материалы работы были доложены на 3 всероссийских и международных конференциях: Всероссийская научная конференция, посвящённая 105-летию кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ и памяти заслуженных профессоров ПГНИУ В. А. Верещагиной и Е. И. Демьяновой (Пермь, 2022), Всероссийская конференция

«Коллекции как основа изучения генетических ресурсов растений и грибов» (Санкт-Петербург, 2022), XI Международная конференция "Проблемы лесной фитопатологии и микологии" (Петрозаводск, 2022).

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из которых 5 — статьи в журналах, индексируемых РИНЦ и Scopus, и 3 — тезисы и материалы конференций.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Штаммы являются основой для любого биотехнологического производства. Для их успешного применения, необходимым является создание коллекций, в которых поддерживается жизнеспособность штаммов и их биологические характеристики (способность продуцировать биоактивные соединения, плодовые тела и т.д.).

На сегодняшний день, применяется широкий спектр методов хранения чистых культур макромицетов, включающий в себя группу протоколов хранения на агаризованных средах, в лиофилизированном и замороженном состоянии. Применение тех или иных методов обуславливается характеристиками штамма и его способностью сохранять свои свойства и жизнеспособность после длительных периодов хранения согласно выбранным протоколам.

1.1 Хранение на агаризованных средах. Широко применяется группа методов субкультивирования — хранения штаммов на агаризованных средах различного состава с регулярным пересевом на новые, стерильные носители. Рекомендуемая частота пересевов варьирует в зависимости от скорости роста исследуемых штаммов, температуры хранения и используемых питательных сред. Серийные пересевы рекомендуется проводить раз в 3 месяца в случае хранения при комнатной температуре и раз в 6–8 месяцев при хранении при +5 °C (Onions, 1971). Помимо очевидных преимуществ (сравнительная простота, низкая стоимость расходных материалов), данные методики обладают рядом недостатков — высокие трудозатраты, повышение риска контаминации культуры, необходимость в наличии больших объемов свободного места, лабораторной посуды и реактивов, что делает поддержание крупных коллекций штаммов затруднительным.

В ряде работ было изучено влияние длительных периодов хранения методами субкультивирования на морфолого-культуральные признаки изучаемых штаммов. Было отмечено замедление роста колоний, потеря

характерных морфологических структур, снижение вирулентности для фитопатогенных и энтомопатогенных видов и т. д. (Samšínáková, Kalalova, 1983; Humber, 1997; Borman et al., 2006). Молекулярные механизмы формирования мутаций при длительном последовательном субкультивировании изучены сравнительно слабо. Известно возникновение однонуклеотидного полиморфизма (ОП) у штаммов, претерпевавших множественные последовательные пересевы. ОП был отмечен в генах *Ganoderma lucidum*, кодирующих ряд ферментов, отвечающих за функционирование мевалонатного пути, синтеза 1,3-β-глюкана и цикла трикарбоновых кислот, после 4 лет субкультивирования при регулярных пересевах каждые 45 сутки. ОП был зарегистрирован в 18 из 60 изученных генов, в 14 из них — в районе экзонов. Несинонимичные ОП были найдены в 2 генах, кодирующих мевалонатный путь, и в 5 генах, ответственных за синтез лигнин-разрушающих ферментов. Появление ОП может приводить к изменениям во внутриклеточных биохимических процессах и, с их накоплением, влиять на продукцию состав и активность биологически активных соединений (Sakurai et al., 2019).

Помимо стандартного протокола субкультивирования, широко применяется ряд методов хранения штаммов на пробирках со скошенной агаризованной средой под слоем дистиллированной воды или минерального масла, что позволяет повысить продолжительность хранения, увеличив временные промежутки между регулярными пересевами до 3 лет, снизить риск высыхания и бактериальной или зоологической контаминации (Humber, 1997; Jong, Birmingham, 2001; Nakasone et al., 2004; Richter et al., 2016). Эффективность хранения на агаризованных средах под слоем стерильной дистиллированной воды была показана для представителей разных таксономических и эколого-трофических групп грибов (Ellis, 1979; Croan et al., 1999; Richter et al., 2010). При этом, отмечено, что ксилосапротрофные макромицеты, как правило, лучше переживают длительные периоды хранения, сохраняя жизнеспособность после 20 лет хранения при +5 °C

(Richter, 2008; Richter et al., 2010; Richter et al., 2016). Разработано несколько вариантов хранения культур под слоем дистиллированной воды. Стандартный протокол подразумевает помещение блоков агаризованной среды с развившимся мицелием в запаиваемые стеклянные флаконы, содержащие стерильную дистиллированную воду и последующим хранением при комнатной температуре (Castellani, 1963). Модификации данного метода предлагают использовать пробирки с ватно-марлевыми пробками или закручивающимися крышками, замену дистиллированной воды физиологическим раствором и дальнейшее хранение при +5 °C (Burdsall, Dorworth, 1994). Может применяться асептическое внесение дистиллированной воды в пробирки со скошенной агаризованной средой с развившимся мицелием (Benedek, 1962; Castellani, 1963; McGinnis et al., 1974; de Capriles et al., 1989; Jong, Birmingham, 2001; Maia et al., 2012; Singh et al., 2018; Castro-Rios, Bermeo-Escobar, 2021).

Использование минеральных масел в хранении штаммов макромицетов также позволяет значительно увеличить временные промежутки между пересевами до 2 лет, снизить риск бактериального и зоологического инфицирования культур (Stebbins, Robbins, 1949; Fennell, 1960). Стандартная методика хранения культур подразумевает внесение стерильного минерального масла в пробирки поверх скошенной среды с мицелием и дальнейшим хранением при комнатной температуре или в холодильной камере (Perrin, 1979; Nummer, 1997). Эффективность протоколов хранения под слоем минерального масла показана для разных таксономических и эколого-трофических групп грибов (Утепешева, 2019). Тем не менее, применение данных протоколов осложняется высокой трудозатратностью, большими объемами занимаемого пространства для хранения пробирок и необходимостью освобождать культуры от излишков минерального масла после изъятия с хранения. В ряде работ были показаны противоречивые результаты в способности помещённых на хранение штаммов сохранять свою жизнеспособность после длительных периодов

хранения под слоем минерального масла (Buell, Weston, 1947; Stebbins, Robbins, 1949; Smith, Onions, 1983; Johnson, Martin, 1992; Homolka, Lisá, 2008; Colauto et al., 2012b). Расхождение в результатах может быть связано с разной молекулярной массой используемого минерального масла и возможной контаминацией пробирок, с видо- и, предположительно, штаммоспецифичностью. Исходя из этого, использование минерального масла и дистиллированной воды в хранении коллекций штаммов целесообразно использовать в комплексе с традиционным серийным пересевом культур и методами криохранения (Псурцева и др., 2014).

1.2 Хранение в сублимированном состоянии. Протоколы сублимационной сушки широко распространены в хранении бактерий, дрожжеподобных и мицелиальных микромицетов, формирующих конидии и хламидоспоры (Охапкина, 2009; Похиленко и др., 2009; Кривушина и др., 2019). Для неспорулирующих базидиальных макромицетов метод лиофилизации применяется сравнительно редко. Данные об эффективности лиофилизации для сохранения жизнеспособности мицелия базидиальных грибов разнятся. Стандартная методика, включающая использование агаровых блоков, помещенных под слой 10 % раствора трегалозы, показала свою неэффективность (Palacio et al., 2014). Тем не менее, сохранение жизнеспособности после хранения в сублимированном состоянии в течение 2 месяцев было отмечено для ряда видов базидиальных макромицетов (Smith, Onions, 1983; Tan et al., 1991; Sundari, Adholeya, 1999; Ivanushkina et al., 2010; Homolka, 2014).

Был предложен протокол подготовки образцов мицелия макромицетов к лиофильной сушке, включающий выявление оптимального возраста культур, проведение двухступенчатой заморозки с использованием криопротекторных соединений и подбор регидратирующего раствора (Sundari, Adholeya, 1999). Для штамма *Laccaria fraterna* (Sacc.) Pegler, подготовленного к лиофилизации по указанному протоколу, наибольшую устойчивость к низким температурам и вакуумной сушке показал мицелий

возрастом от 3 до 7 недель, помещенный в 10 % раствор диметилсульфоксида (ДМСО). Данный протокол был успешно применен к штаммам видов *Laccaria amethystina* Cooke, *L. laccata* (Scop.) Cooke и др. (Sundari, Adholeya, 1999). Было показано, что хранение в сублимированном состоянии не оказывает негативного действия на активность амилаз, липаз, уреаз, целлюлаз и лигнинразрушающих ферментов штаммов *L. amethystina*, *L. fraterna*, *L. laccata* и ряда других (Sundari, Adholeya, 2000a; Sundari, Adholeya, 2000b).

При помещении культур на хранение методами лиофилизационной сушки возможно применение питательных субстрат-носителей. Сохранение жизнеспособности после сублимации было показано для штаммов *Agaricus bisporus*, *A. bitorquis* (Quél.) Sacc., *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Volvariella volvacea*, произрастающего на зернах жемчужного проса, использованного в качестве носителя (Singh et al., 2004a).

Применение лиофилизации в хранении культур базидиальных макромицетов представляется перспективным направлением. Тем не менее, для сохранения жизнеспособности исследуемых культур необходим поиск оптимальных условий культивирования, криопротекторных соединений и/или их комбинаций, субстрат-носителей, создание более узкоспециализированных протоколов заморозки (Croan, 2000; Singh et al., 2004b; Palacio et al., 2014).

1.3 Хранение при отрицательных температурах. Хранение при отрицательных температурах (криохранение) — группа протоколов поддержания жизнеспособности штаммов путем заморозки культур микроорганизмов и дальнейшим содержанием при широком спектре отрицательных температур. На данный момент, методы криохранения считаются наиболее надежным и эффективным способом сохранения жизнеспособности штаммов макромицетов, не требующим больших затрат лабораторного оборудования и расходных материалов. Необходимым остается наличие холодильных установок, обеспечивающих хранение

культур при спектре температур от -80°C до -196°C (Охапкина, Шабалин, 2009; Humber, 1997; Ryan, Smith, 2007; Homolka, 2013; Singh, Baghela, 2017). Создан ряд протоколов по криохранению культур макромицетов, включающих в себя подбор температуры хранения, скорости замораживания, использование субстратов-носителей и криопротекторных соединений (Homolka et al., 2006; Ozerskaya et al., 2013; Wolkers, Oldenhof, 2021; Linde et al., 2018; Sato et al., 2019).

1.3.1 Температура. Одним из факторов, влияющих на сохранение жизнеспособности культур, является температура хранения культур и скорость заморозки. Наиболее распространено использование морозильных установок, обеспечивающих хранение культур при температуре -80°C . Одними из наиболее эффективных протоколов заморозки считают содержание культур при спектре температур ниже -139°C . Применяется также и хранение в парах жидкого азота при температуре -196°C , что, согласно ряду сообщений, может обеспечивать наиболее высокую геномную и фенотипическую стабильность (Ryan, Smith, 2007). Возможно использование бытовых морозильных установок, осуществляющих заморозку культур до -20°C , но протоколы содержания штаммов макромицетов в спектре температур от -20°C до -60°C применяются сравнительно редко ввиду более высокого риска получения культурами криотравм широкого спектра (Humber, 1997). Тем не менее, для *Pleurotus ostreatus* было показано успешное применение протоколов хранения при -20°C , включающих использование криопротекторных соединений (глюкоза, сахароза, глицерин и т.д.) и питательного субстрата в виде зерен пшеницы, овса, риса и блоков картофельно-глюкозного агары (Mantovani et al., 2012).

Микроструктура кристаллов льда меняется в зависимости от температуры, скорости ее понижения и атмосферного давления. В процессе охлаждения воды от 0°C до -25°C происходит последовательное образование кристаллов льда в форме тонких гексагональных пластин, игл, полых колонн из призм, древоподобных структур и, снова, гексагональных

пластин, наносящих механические повреждения гифам гриба и цитоплазматическим структурам (Mason et al., 1963; Linde et al., 2018). Помимо механических повреждений, вызываемых кристаллами льда, следствием медленного замораживания является также и резкое повышение концентрации электролитов, растворенных в цитоплазме и окружающем гифы пространстве, например, питательной среде. Это связано с потерей внутриклеточной воды и приводит к необратимым изменениям в структуре клеточных белков (Lovelock, 1953a; Lovelock, 1953b). Микрорекристаллы льда, формирующиеся в межклеточном пространстве, как правило, несут меньшую опасность, по сравнению с внутриклеточными кристаллами (Pegg, 2010).

Сохранение жизнеспособности культур зависит и от скорости заморозки, которая влияет на транспорт жидкой фазы в клеточной мембране (Mazur, 1963). Скорость заморозки оказывает влияние на скорость изменения концентрации растворенных в цитоплазме и окружающей клетки жидкости соединений, от чего зависит объем воды, покидающей клетку в процессе заморозки и возвращающейся обратно в процессе оттаивания, и скорость этих процессов. При замораживании, вода выходит из клетки, что приводит к повышению концентрации растворенных соединений, что, в свою очередь, снижает температуру, необходимую для ее перехода в твердое состояние, позволяя сохранить цитоплазму в охлажденном, но не кристаллизованном состоянии. При слишком быстрой заморозке, жидкая фракция не успевает покинуть клетку в достаточном объеме, что приводит к формированию внутриклеточных кристаллов льда, наносящих летальные повреждения клеткам (Mazur, 1963; Mazur et al., 1984; Mazur et al., 1992; Karlsson et al., 1993; Smith, Thomas, 1997). В свою очередь, слишком медленный процесс заморозки вызывает излишнюю дегидратацию клетки, что также приводит к гибели клеток. Тем не менее, предполагается, что образование внутриклеточных кристаллов льда не является прямой причиной гибели клеток (Farrant, 1977; Fowler, Toner, 2005). Была представлена гипотеза, утверждающая, что гибель культур может быть связана с процессом

перекристаллизации, происходящим при оттаивании клеток (Mazur, 2010). В пользу данной гипотезы говорит тот факт, что ряд видов дрожжевых и мицелиальных микромицетов, обитающих в экотопах с температурами, близкими к нулю, способны к формированию и накоплению больших объемов ингибиторов перекристаллизации белковой природы, т.н. “лед-связывающих протеинов” (Lee et al., 2010; Xiao et al., 2010; Arai et al., 2019).

Вычисление наиболее оптимальной скорости заморозки культур было объектом ряда исследований. Для сохранения жизнеспособности штаммов бактерий и грибов чаще всего применяют скорость заморозки в $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (Hwang, 1960; Hwang, 1966; Hwang, 1968; Morris et al., 1988; Smith, Thomas, 1997; Ivanushkina et al., 2010; Lalaymia et al., 2014). Для достижения таких значений скорости снижения температуры используют программируемые морозильные установки или термоохлаждаемые контейнеры. Подобная скорость является стандартной для криозаморозки тканей, отдельных клеток и эмбрионов высших животных (Leibo, 1986; Rubinsky et al., 1988). Для культур грибов рекомендуется применять методы быстрого оттаивания культур, например, помещение в теплую воду, что позволяет избежать рекристаллизации льда в процессе медленного размораживания (Kolkowski, Smith, 1995). Тем не менее, возможно применение и заморозки с неизвестной скоростью снижения температуры (неконтролируемой заморозки), подразумевающей помещение культур в морозильную установку без указанного оборудования (Kitamoto et al., 2002).

Учитывая крайне высокое таксономическое и эколого-трофическое разнообразие макромицетов, механизмов колонизации субстрата и его переработки, представляется необходимой разработка методик криохранения, специфичных для определенных групп видов (Homolka, 2014; Zaghi et al., 2020). Помимо использования оптимальной температуры хранения, не менее важным в протоколах криохранения является использование криопротекторных соединений и субстратов-носителей.

1.3.2 Криопротекторные соединения. В процессе замораживания происходит формирование внеклеточных кристаллов льда, оказывающих осмотическое давление на клеточные мембраны. Медленное замораживание позволяет избежать формирования крупных кристаллов льда внутри клетки, но может приводить к излишней дегидратации клеток, что в свою очередь, является причиной их гибели из-за резкого повышения концентрации внутриклеточных электролитов (Mazur, 2010). Сохранение жизнеспособности культур макромицетов зависит не только от целостности клеточных мембран, но и от их способности противостоять резким скачкам осмотического давления в процессе замораживания и связанного с ним повышения содержания растворенных соединений. Применение криопротекторных соединений (КПС) необходимо как для искусственного увеличения общей концентрации растворенных соединений в протопласте клеток, так и для обеспечения их плавной дегидратации. Как правило, замораживание культур без добавления КПС приводит к гибели культуры (Lovelock, 1953b; Zaghi et al., 2018).

Для льда характерны как группа кристаллических фаз, так и аморфная форма. Среди 18 известных на сегодняшний день кристаллических фаз льда наиболее распространенной является гексагональная форма I_h , образующаяся во время медленной кристаллизации воды при атмосферном давлении на уровне моря (1013,25 Гпа) (Fang et al., 2013; Zhu et al., 2020; Salzmann et al., 2021). Процесс перехода жидкой фазы в твердую состоит из двух фаз: стадии нуклеации и стадии роста кристаллов. Нуклеация происходит случайным образом в процессе броуновского движения, когда молекулы воды могут сформировать спонтанную, подобную льду структуру, но для формирования кристаллов льда необходимо, чтобы структуры превышали т.н. критический размер зародыша, находящегося в неустойчивом равновесии с окружающей средой. С понижением температуры жидкости и, соответственно, снижением скорости смещения молекул вероятность формирования “ядер” повышается.

При увеличении числа молекул в зародыше кристалла, возможным становится его увеличение в размерах (Alexiades, Solomon, 1986).

Аморфная форма льда в чистой воде или другой однокомпонентой среде может сформироваться только при высоком давлении и крайне быстром охлаждении раствора ($>10^7 \text{ K} \times \text{s}^{-1}$) (Whalley et al., 1989; Kolesnikov et al., 1999; Wolfe, Bryant, 1999). Добавление раствора КПС приводит к увеличению вязкости жидкой фракции снаружи и внутри мицеллия, связыванию молекул воды, что усложняет процесс формирования зародышей льда, что, в свою очередь, снижает температурную точку кристаллизации, переводя воду в переохлажденное состояние и, при дальнейшем охлаждении, превращая ее в стеклоподобную, аморфную форму (Wolfe, Bryant, 1999; Mandumpal et al., 2011). Таким образом, добавление криопротекторных соединений уменьшает не только объем кристаллического льда, образуемого при заморозке, но и смягчает скачок концентрации растворенных электролитов, тем самым позволяя сохранить целостность клеточных стенок мицеллия и, следовательно, его жизнеспособность (Wolkers, Oldenhof, 2021).

Криопротекторы можно классифицировать разными способами (Тао, Li, 1986; Hubálek, 2003; Homolka, 2013; Singh, Baghela, 2017):

1. По способности проникать через клеточные покровы (клеточные стенки и цитоплазматические мембраны) – проникающие (диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин), полупроницающие (моно- и олигосахариды, аминокислоты и т.д.) и не проникающие (полисахариды, протеины, полимеры с высокой молекулярной массой).
2. По скорости проникновения через клеточные покровы. Быстропроникающие (не более 30 минут) – этиленгликоль, ДМСО, диметилформамид. К сравнительно медленно проникающим веществам относят глицерин, моно-, олигосахариды, аминокислоты и др.

3. По химической структуре и молекулярной массе. Диолы (полиэтиленгликоль, пропиленгликоль и др.), моносахариды (глюкоза, ксилоза), дисахариды (сахароза, трегалоза) и т. д.

Проникающие криопротекторные соединения, диффундируя через цитоплазматические мембраны, связываются с внутриклеточной водой, что приводит к снижению точки кристаллизации воды и уменьшению концентрации растворенных электролитов, сохраняя протоплазму в жидком состоянии, что, в свою очередь, защищает клетки от формирования внутриклеточных кристаллов льда и снижает негативный эффект от повышения концентрации растворенных во внутриклеточном матриксе соединений (Chen et al., 1984; Tao, Li, 1986; Chaytor et al., 2012). Полупроницающие криопротекторы вызывают частичную дегидратацию клеток перед замораживанием. Накапливаясь в пространстве между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой, они действуют как буферный слой, защищающий цитоплазматическую мембрану от механических повреждений, наносимых кристаллами льда. Непроницающие КПС не вступают в непосредственное взаимодействие с клеточными покровами, но вызывают частичный отток внутриклеточной жидкости, повышают вязкость окружающего клетку раствора, что тормозит рост кристаллов льда (Olien, Smith, 1981; Colauto et al., 2012b). К негативным эффектам от применения проникающих криопротекторных соединений относят их цитотоксичность, растущую с повышением концентрации раствора, применяемого криопротектора. К наиболее распространенным видам повреждений, вызываемых проникающими КПС относят нарушение работы сигнальной системы клеток, повреждение митохондрий, встраивание в элементы цитоскелета и т.д. (Chaytor et al., 2012; Best, 2015).

ДМСО (диметилсульфоксид) — окисленный тиоэфир, обладающий хорошей растворимостью в воде и криопротекторным эффектом, линейно зависящим от концентрации. ДМСО в качестве криопротекторного соединения широко применяется в хранении культур грибов, бактерий,

клеток высших животных, что обусловлено его способностью связывать широкий спектр плохо растворимых полярных и неполярных молекул и быстро проникать через клеточные покровы (Hubálek, Kochková-Kratochvilová, 1978; Brayton, 1986; Galvao et al., 2014). Помимо криопротекторного действия, ДМСО обладает свойствами радиопротектора (Chapman et al., 1979). В ряде исследований была показана высокая цитотоксичность ДМСО, выражающаяся в угнетении роста колоний, подавлении экспрессии генов, индуцировании оксидативного стресса и апоптоза (MacGregor, 1967; Rammner, Zaffaroni, 1967; Typke, 1996; Randhawa, 2008; Momose et al., 2010; Colauto et al., 2012b). Было отмечено, что сохранение жизнеспособности при использовании протоколов криохранения с применением ДМСО штаммоспецифично и, предположительно, зависит от эластичности клеточных покровов и их толщины (Tomizawa et al., 2007; Colauto et al., 2012a).

Глицерин — один из наиболее широко применяемых КПС, используемых в криохранении клеточного материала различного биологического происхождения, показавший высокую эффективность в сохранении жизнеспособности культур базидиальных макромицетов, в том числе эктомикоризных видов (Tanaka et al., 2013; Linde et al., 2018). В ряде работ было показано, что для криохранения культур базидиомицетов наиболее оптимальными являются 5 % и 10 % растворы глицерина (Ito, Nakagiri, 1996; Mantovani et al., 2012; Linde et al., 2018; Sato et al., 2019).

Глюкоза — полупроницающий криопротектор, также применяемый в протоколах криохранения культур базидиальных макромицетов. Тем не менее, было показано, что использование раствора глюкозы в качестве КПС приводит к снижению жизнеспособности культур базидиомицетов после длительных периодов хранения. Выживаемость зернового мицелия штаммов *Pleurotus ostreatus* после двух лет хранения составила 97,6 % — с добавлением раствора глюкозы и 93 % — без криопротектора. На пятый год хранения процент жизнеспособных культур составил 88,6 % и 91 %, соответственно.

При этом, штаммы вида *Agaricus subrufescens* Peck после двух лет хранения показали в среднем 94,4 % сохранения жизнеспособности при добавлении раствора глюкозы и 98,3 % – без раствора КПС. После пяти лет выживаемость составила 65 % в пробирках с добавлением раствора глюкозы и 86% – в его отсутствие (Zaghi et al., 2020). Потерю жизнеспособности культур базидиальных макромицетов можно связать с цитотоксичностью глюкозы, а также с индивидуальными характеристиками штаммов изученных видов (Tchounwou et al., 2014). Цитотоксичное действие глюкозы возникает при превышающих норму значениях внутриклеточной концентрации глюкозы и выражается в развитии оксидативного стресса, стресса ЭПР, митохондриального стресса, что приводит к выбросу активных форм кислорода и гибели клетки (Tesauro, Mazzotta, 2020).

Положительный эффект применения раствора сахарозы в качестве КПС был отмечен для ряда бактериальных штаммов, вирусов и облигатного симбионта *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler, образующего арбускулярную микоризу (Calcott, MacLeod, 1974; Sehgal, Das, 1975; Chavarri et al., 1988; Declerck, Angelo-Van Coppenolle, 2000; Panoff et al., 2000). При этом, опыт использования сахарозы в криохранении макромицетов сравнительно небольшой. Применение растворов сахарозы различной концентрации показало хорошие результаты для штаммов видов *Agaricus blazei* Murrill, *A. subrufescens*, *Lentinus crinitus* (L.) Fr. и *Pleurotus ostreatus* (Colauto et al., 2012b; Mantovani et al., 2012; Zaghi et al., 2018; Bertéli et al., 2022).

Трегалоза — дисахарид, накапливаемый в цитозоли растительных и грибных клеток, в частности, в покоящихся структурах (споры, склероции и клетки, находящиеся в стационарной фазе развития), нашедший широкое применение в криохранении бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов (Jorge et al., 1997; Garg et al., 2002; Patist, Zoerb, 2005; Mahmud et al., 2009). Повышение концентрации трегалозы во внутриклеточном матриксе было отмечено для клеток, претерпевающих дегидратацию и другие формы

стресса (Ribeiro et al., 1999; Saharan, Sharma, 2010). В случае наступления неблагоприятных условий, повышение содержания трегалозы необходимо для стабилизации мембранных фосфолипидов и протеинов, что позволяет клетке сохранить жизнеспособность (Tereshina et al., 2011; Feofilova et al., 2014).

Положительные результаты в сохранении жизнеспособности культур макромицетов были показаны для протоколов криохранения, включающих в себя использование смешанных растворов КПС. Сохранение жизнеспособности культур эктомикоризных базидиомицетов было показано для ряда протоколов, включающих в себя использование комбинаций проникающих и непроникающих криопротекторов. Применение комбинированных растворов КПС с различными концентрациями компонентов позволяет усилить криопротекторный эффект без повышения риска нанесения повреждений мицелию, связанных с токсичностью отдельных составляющих смеси КПС (Sato et al., 2019; Sato et al., 2020).

1.3.3 Использование субстратов-носителей. На сегодняшний день, широко распространено использование метода “агаровых блоков”, подразумевающего помещение фрагментов агаризованной среды с развившимся мицелием в раствор КПС с дальнейшим замораживанием (Hwang, 1960; Hwang, 1966; Hwang, 1968). К модификациям данного метода относят широко распространенные варианты протокола с использованием трубочек из полипропилена или ПВХ, внутрь которых помещают блоки агаризованной среды с мицелием с дальнейшим запаиванием краев и замораживанием (Elliott, 1976; Challen, Elliott, 1986; Stalpers et al., 1987; Hoffmann, 1991; Homolka et al., 2003; Colauto et al., 2012b). Разработан протокол криохранения, включающий в себя выращивание культур в криопробирках со скошенной агаризованной средой с дальнейшим внесением раствора КПС и помещением в морозильную установку (Voignon et al., 2009; Crahay et al., 2013). Метод “агаровых блоков” и его модификации показали высокую эффективность в хранении широкого спектра видов

макромицетов, но, тем не менее, не все базидиальные макромицеты могут сохранять жизнеспособность после длительных периодов хранения согласно указанным протоколам, например, виды, образующие эктомикоризу (Ito, Nakagiri, 1996; Danell, Flygh, 2002; Crahay et al., 2013; Sato et al., 2019).

Разработаны протоколы криохранения с использованием минеральных и органических субстратов-носителей. Среди минеральных субстратов-носителей можно выделить вспененный перлит различных фракций — аморфную алюмосиликатную породу вулканического происхождения, обладающую высокими адсорбционными и теплоизолирующими характеристиками (Sodeyama et al., 1999). Был предложен “перлитовый протокол”, включающий в себя инокуляцию стерильного смоченного жидкой питательной средой с добавлением КПС перлита, с дальнейшей инкубацией и помещением в морозильную установку (Homolka et al., 2001).

Замораживание штаммов проходит через следующие этапы: культура подвергается охлаждению с падением температуры до точки замерзания воды. При дальнейшем охлаждении начинает запускаться процесс нуклеации, который приводит к резкому скачку температуры в участке около точки кристаллизации до уровня точки замерзания жидкой фракции. Скачок температуры связан с выбросом скрытой теплоты образца. Затем, происходит дальнейшее охлаждение уже кристаллизованного образца до установленной программой температуры (Tan et al., 2021). Использование обладающего высокими теплоизолирующими характеристиками вспененного перлита позволяет значительно сгладить скачок температур в процессе замораживания, что, предположительно, позволяет сохранять жизнеспособность культур. Помимо этого, применение вспененного перлита в качестве субстрата-носителя позволяет значительно увеличить объем штаммов, находящегося на хранении в стандартных криопробирках, по сравнению с протоколами метода “агаровых блоков” (Homolka et al., 2001). В отличие от протоколов метода “агаровых блоков”, подразумевающих

вырезание блоков среды с мицелием и помещением в раствор КПС, при использовании “перлитового протокола” мицелий изучаемого штамма не подвергается механическим повреждениям в процессе изъятия из слоя агаризованной среды (Homolka et al., 2001).

Данный протокол показал свою эффективность в хранении широкого спектра видов микро- и макромицетов и ряда дрожжей (Homolka et al., 2007; Homolka, 2014). Были разработаны модифицированные варианты “перлитового протокола”, включающие в себя введение раствора КПС за короткий промежуток времени перед заморозкой, а не в начале периода инкубации, которые были успешно применены в хранении ряда видов эктомикоризных базидиомицетов (Sato et al., 2012; Sato et al., 2019).

Высокая эффективность была показана для протоколов криохранения культур базидиомицетов с использованием зерен пшеницы, проса, риса, подвергнутых паровой и тепловой обработке (Colauto et al., 2011; Linde et al., 2018; Bertéli et al., 2022). Для *Agaricus bisporus* было показано сохранение жизнеспособности при использовании зерен пшеницы в качестве субстрата-носителя в отсутствие криопротекторных соединений (Mata, Estrada, 2005). Эндосперм зерен зерновых злаков отличается высоким содержанием крахмала, ряда аминокислот и жирных кислот, служащих богатым источником питания для мицелия (Šramková et al., 2009; Kowieska et al., 2011). Содержащиеся в эндосперме зерна углеводы и белки связывают молекулы воды, снижая объем свободной воды и, следовательно, количество внеклеточных кристаллов льда, сводя к минимуму риск получения мицелием механических повреждений. Помимо этого, важную роль может играть капиллярная микроструктура эндосперма зерна, которая ограничивает объем свободной воды, что препятствует формированию внеклеточных кристаллов льда (Tanaka et al., 2013; Marsola et al., 2022). Вместе с этим, содержащийся в зернах крахмал относится к группе непроникающих криопротекторов, оказывая дополнительный положительный эффект на выживаемость культур на протяжении криохранения (Singh, Baghela, 2017). Протокол с

использованием зерен проса также показал свою высокую эффективность в отсутствие раствора криопротектора для мицелия ряда коммерческих штаммов макромицетов (Mata, Pérez-Merlo, 2003).

Вместе с зерновым материалом в криохранении культур базидиальных макромицетов применяют целлюлозосодержащие субстраты-носители. Использование опилок бука городчатого, *Fagus crenata* Blume, в качестве субстрата-носителя показало свою эффективность для культур видов, относящихся к отделам Oomycota, Zygomycota, Ascomycota и Basidiomycota, в том числе в варианте протокола без добавления раствора КПС и при неконтролируемой скорости замораживания (Kitamoto et al., 2002). Для сохранения жизнеспособности культур эктомикоризных базидиомицетов были разработаны протоколы криохранения с использованием содержащей активированный уголь фильтровальной бумаги и измельченного вермикулита в качестве субстратов-носителей (Stielow et al., 2012; Sato et al., 2020).

Макромицеты — группа организмов, обладающая высоким промышленным и биотехнологическим потенциалом. Их незаменимая роль в экосистемах, способность продуцировать уникальные активные соединения, высокая пищевая ценность и т. д. делают целесообразным создание коллекций штаммов для сохранения видового разнообразия и возможного использования в промышленности. Ключевым фактором в создании коллекций штаммов макромицетов является сохранение их физиологической активности и биохимических характеристик на протяжении всего периода хранения. В связи с этим, перспективным представляется проведение дополнительных исследований влияния методов хранения на физиологию макромицетов, что позволит расширить список промышленно применяемых видов, повысить эффективность работы коллекций штаммов и создать базу для более углублённого изучения их биохимических характеристик.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Формирование коллекции чистых культур макромицетов

2.1.1 Места сбора плодовых тел

Для создания коллекции штаммов макромицетов в период с 2019 по 2023 год проводили сбор плодовых тел и изоляцию чистых культур макромицетов, относящихся к различным таксономическим и эколого-трофическим группам. Особое внимание уделяли видам, включённым в Красную книгу РФ и региональные Красные книги, а также видам, которые, по литературным данным, обладают высоким биотехнологическим потенциалом. Кроме того, в коллекцию был включён и ряд промышленных штаммов.

За указанный период был проведён ряд полевых выездов и экспедиций. Сбор и выделение изолятов макромицетов осуществляли в г. Москве и Московской области, Приморском крае (на территории Уссурийского заповедника ДВО РАН и сопредельных территориях), Республике Адыгея (на территории Кавказского государственного природного биосферного заповедника им. Х.Г. Шапошникова и сопредельных территориях) и в г. Минск, Республика Беларусь (рис. 1, 2). Видовые названия и таксономическую принадлежность присваивали в соответствии с базой данных CABI Bioscience Databases Index Fungorum. Эколого-трофические группы видов грибов устанавливали по классификации Коваленко А.Е. (Коваленко, 1980). Полученные штаммы включали в состав коллекции кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, входящей в состав электронной базы данных World Data Centre for Microorganisms (<https://ccinfo.wdcm.org/>).

Сбор плодовых тел проводили маршрутным методом (Бондарцев, Зингер, 1950; Великанов и др., 1980). Перед сбором плодовые тела фотографировали, фиксировали координаты точки сбора при помощи GPS-навигатора Garmin eTrex 10. Проводили описание места сбора и субстрата.

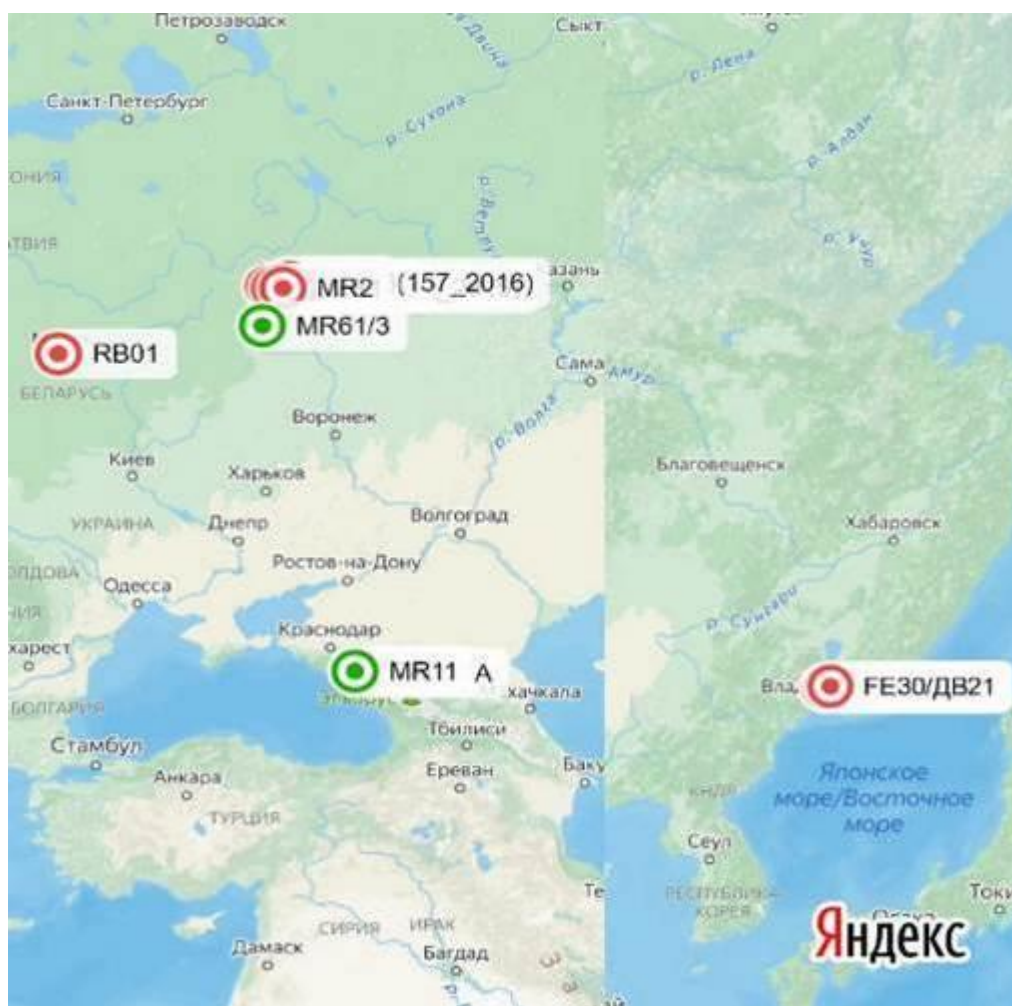


Рис. 1. Места сбора плодовых тел макромицетов.

2.1.2 Изоляция чистых культур макромицетов

Изоляцию проводили тканевым способом, помещая фрагменты трамы на следующие агаризованные среды: модифицированная среда на основе пивного суслу (4 градуса по Баллингу) (Пидопличко, 1953) и среда № 337 по стандарту American Type Culture Collection (ATCC) (картофель 300 г, глюкоза 20 г, дрожжевой автолизат 5 г, агар 15 г, дистиллированная вода 1000 мл). Данные питательные среды были выбраны как наиболее универсальные для изоляции культур макромицетов разных таксономических и эколого-трофических групп. Для подавления бактериального роста в питательные среды вносили антибиотики цефалоспоринового ряда III поколения (цефтриаксон или цефотаксим) из расчета 0,75 мг/мл питательной среды.

После изоляции штаммы помещали на хранение в коллекцию штаммов макромицетов кафедры микологии и альгологии Биологического

факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Информацию о полученном штамме и месте сбора плодовых тел вносили в электронную базу данных. Из собранных плодовых тел изготавливали ваучерный гербарный образец с последующей передачей на хранение в гербарий Ботанического института им. В.Л. Комарова.

2.1.3 Видовая идентификация макромицетов

Видовую идентификацию осуществляли по морфологии плодовых тел с использованием общепринятых определителей и опубликованных ревизий отдельных родов (Бондарцев, 1950; Николаева, 1961; Бондарцева, 1998; Змитрович, 2008; Hansen, Knudsen, 1992, 1997, 2000; Das et al., 2013). Видовые названия присваивали в соответствии с базой данных CABI Bioscience Databases Index Fungorum. Для подтверждения видовой принадлежности были применены молекулярно-генетические методы. Для части штаммов были получены ДНК-штрихкоды по участку ITS, который сегодня признан универсальным генетическим маркером для грибов. ДНК из мицелия чистой культуры выделяли при помощи СТАВ-буфера. Для идентификации штаммов амплифицировали участок ITS с праймерами ITS1F и ITS4. ПЦР проводили в амплификаторе Bio-Rad T100 (США), в качестве реакционной смеси использовали смесь для ПЦР ScreenMix (Евроген, Москва). Амплификант визуализировали в 1%-м агарозном геле, для очистки ПЦР продукта использовали набор Cleanup Standard (Евроген, Москва). Секвенирование ДНК проводила компания “Евроген” с использованием праймеров ITS1F и ITS4 на секвенаторе Applied Biosystems 3730xl (Applied Biosystems, США). Для подтверждения видовой принадлежности, был проведен поиск сходных нуклеотидных последовательностей через алгоритм BLAST (необходимый процент сходства устанавливали в 99,5 %). Вновь полученные последовательности были депонированы в GenBank.

2.1.4 Базовая коллекция штаммов макромицетов

В результате работы по сбору и выделению чистых культур была сформирована базовая коллекция, которая включала 74 штамма 43 видов 30 родов макромицетов (рис. 2) (табл. 19, Приложение 2). Из них 40 видов принадлежат к отделу Basidiomycota, 3 — к отделу Ascomycota (рис. 3). На хранение было помещено 4070 единиц хранения.

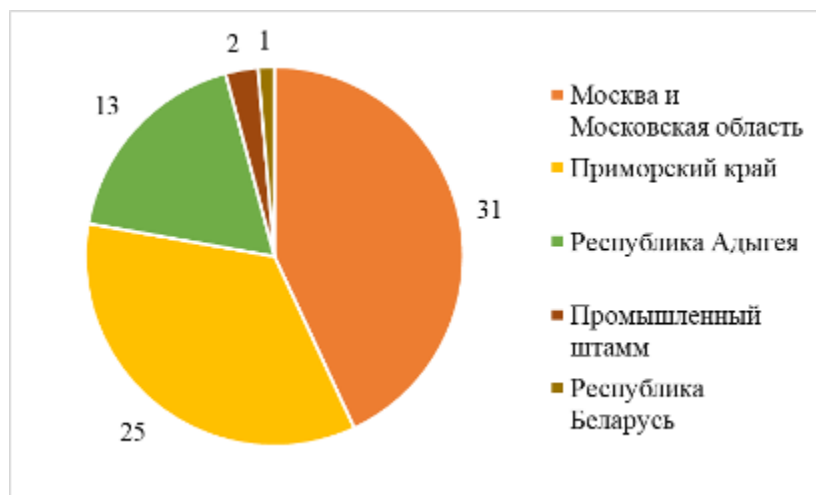


Рис. 2. Географическая принадлежность штаммов чистых культур базовой коллекции.

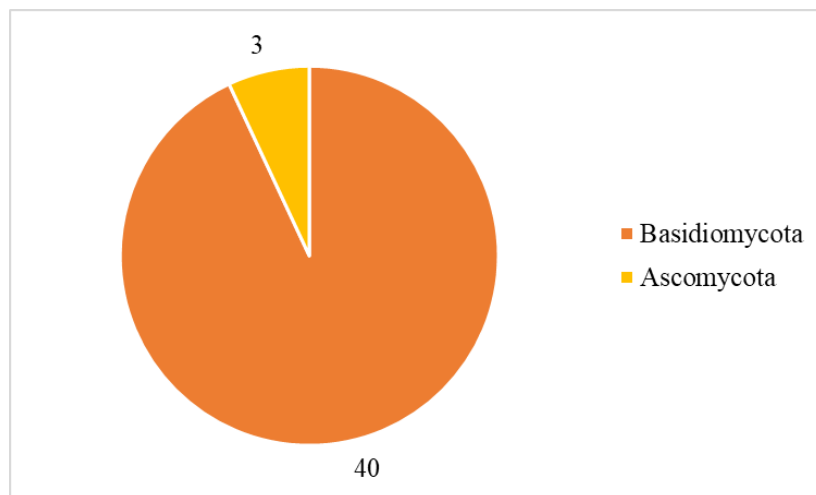


Рис. 3. Таксономическая принадлежность выделенных штаммов чистых культур макромицетов.

В состав коллекции вошли штаммы видов макромицетов, обладающих высоким биотехнологическим потенциалом, штаммы промышленно культивируемых видов макромицетов и видов, включённых в Красную книгу РФ и региональные Красные книги. Таблица штаммов представлена в

Приложении 2. Из числа коллекционных штаммов чистых культур к сапротрофам относят 65 штаммов, включающих в себя 53 штамма, развивающихся на древесных субстратах (ксилосапротрофов), 10 штаммов, относящихся к подгруппе гумусовых сапротрофов, и 2 — подстильных сапротрофа. Среди остальных 9 штаммов, 8 — относят к группе паразитов древесных растений и 1 штамм паразитов насекомых (рис. 4, 5).

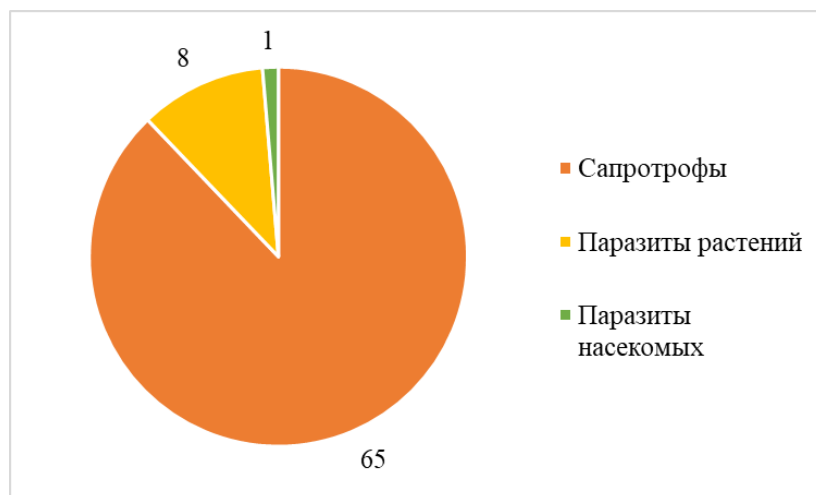


Рис. 4. Эколого-трофические группы штаммов чистых культур, входящих в состав базовой коллекции.

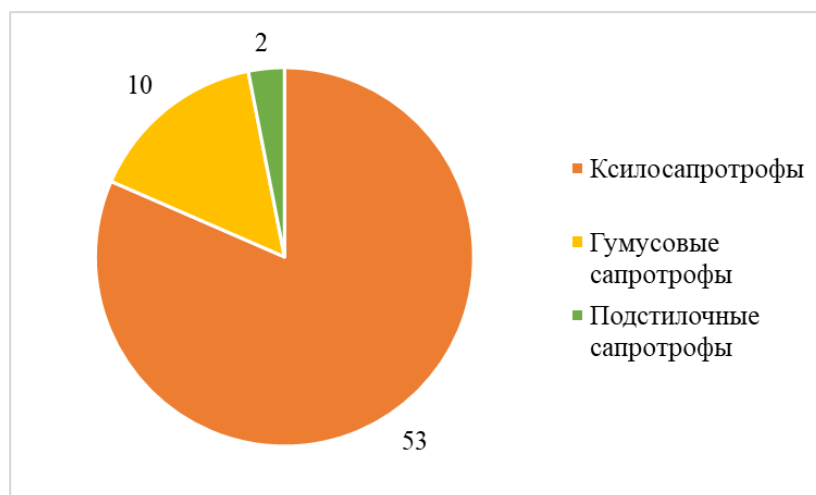


Рис. 5. Число штаммов базовой коллекции чистых культур (по подгруппам сапротрофной эколого-трофической группы).

2.1.5 Рабочая коллекция штаммов макромицетов

Для дальнейшей работы были отобраны 20 штаммов, составившие рабочую коллекцию (табл. 1). Отбор штаммов проводили с целью включить в коллекцию виды, относящихся к разным таксономическим и эколого-трофическим группам, многие из которых нашли прикладное применение в пищевой промышленности. Выбранные штаммы принадлежат видам, относящимся к порядкам Agaricales, Auriculariales, Hypocreales, Pezizales, Phallales, Polyporales и Russulales (рис. 6).

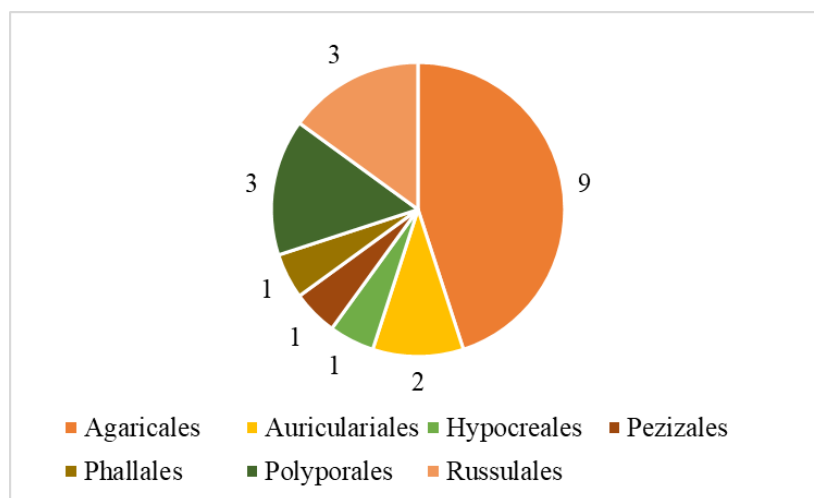


Рис. 6. Таксономическая принадлежность выделенных штаммов чистых культур макромицетов (продолжение).

Согласно используемой классификации эколого-трофических групп, макромицеты делят на следующие трофические группы: сапротрофы, симбиотрофы и паразиты. Данные группы подразделяют на подгруппы по приуроченности к тому или иному субстрату (обозначения: Ну — гумусовый сапротроф, Le — на древесине, Par — паразит на деревьях и кустарниках, Pin — паразит на насекомых) (Коваленко, 1980; Столярская, Коваленко, 1996; Змитрович и др., 2015). Среди 20 штаммов, включённых в рабочую коллекцию, 17 штаммов входят в группу сапротрофов (12 — ксилосапротрофы, 5 — гумусовые сапротрофы), 2 — паразиты древесных растений и 1 — паразит насекомых).

Таблица 1. Рабочая коллекция штаммов чистых культур макромицетов.

Штамм	Вид	Субстрат	Охранный статус
Гумусовые сапротрофы (Hu)			
PR58	<i>Agaricus bisporus</i> (J.E. Lange) Imbach	Компост III фазы	Не включен в список охраняемых видов
RA01	<i>Mycetinis alliaceus</i> (Jacq.) Earle ex A.W. Wilson & Desjardin	Почва	Не включен в список охраняемых видов
RA02	<i>Phallus impudicus</i> L.	Почва	27 региональных Красных книг
MR61	<i>Sarcosoma globosum</i> (Schmidel) Casp.	Почва	Красная книга РФ и 25 региональных Красных книг
Ксилосапротрофы (Le)			
MR16	<i>Auricularia auricula-judae</i> (Bull.) Quél.	Валеж <i>Populus tremula</i> L.	2 региональные Красные книги
FE25	<i>Auricularia nigricans</i> (Sw.) Birkebak, Looney & Sánchez-García	Валеж лиственной породы	Не включен в список охраняемых видов
MR55*	<i>Flammulina rossica</i> Redhead & R.H. Petersen	Валеж <i>Betula</i> sp.	Не включен в список охраняемых видов
MR40*	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Пень <i>Betula</i> sp.	Красная книга РФ и 62 региональные Красные книги
MR57*	<i>Hericium coralloides</i> (Scop.) Pers.	Валеж лиственной породы	61 региональная Красная книга
FE53*	<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.) Pers.	Валеж лиственной породы	10 региональных Красных книг
RA09	<i>Hericium flagellum</i> (Scop.) Pers.	Валеж лиственной породы	Красная книга РФ и 5 региональных Красных книг
FE20	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	Валеж <i>Quercus mongolica</i> Fisch. Ex Ledeb.	1 региональная Красная книга (Красная книга Приморского края)
RA03	<i>Lycoperdon pyriforme</i> Schaeff.	Почва	Не включен в список охраняемых видов
FE34*	<i>Mycoleptodonoides vassiljevae</i> Nikol.	Валеж лиственной породы	Не включен в список охраняемых видов
FE27*	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> Singer	Валеж <i>Ulmus</i> sp.	Не включен в список охраняемых видов
PR62	<i>Pleurotus nebrodensis</i> (Inzenga) Quél.	Солома <i>Triticum aestivum</i> L.	Красная книга РФ и Красная книга Республики Крым
MR1*	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	Валеж <i>Populus tremula</i> L.	Красная книга Ульяновской области
Паразиты древесных растений (Par)			
RA04	<i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) With.	Ствол живого <i>Quercus</i> sp.	16 региональных Красных книг
FE30*	<i>Sparassis latifolia</i> Y.C. Dai & Zheng Wang	Ствол живого <i>Pinus koraiensis</i> Siebold & Zucc.	Красная книга Еврейской Автономной области
Паразиты насекомых (Pin)			
MR67	<i>Cordyceps militaris</i> (L.) Fr.	Личинка мухи	7 региональных Красных книг

Прим. Обозначения в номерах штаммов: FE — Приморский край, MR — г. Москва и Московская область, PR — промышленный штамм, RA — Республика Адыгея;

* — видовая принадлежность подтверждена молекулярно-генетическими методами.

В рабочую коллекцию вошли штаммы следующих видов:

1. *Agaricus bisporus* (шампиньон двуспоровый) — широко известный и промышленно культивируемый во многих странах макромицет, обладающий высокой пищевой ценностью (Furlani, Godoy, 2008).
2. *Auricularia auricula-judae* (аурикулярия уховидная, «Иудино ухо») — широко культивируемый в странах Азии макромицет, известный своими высокими пищевыми качествами и обладающий фармацевтическим потенциалом (Yoon et al., 2003; Kadnikova et al., 2015) (Приложение 1, рис. 18).
3. *Auricularia nigricans* (аурикулярия густоволосистая) — как и предыдущий вид, широко культивируется в странах Азии. Обладает большим биотехнологическим потенциалом (Chen, Xue, 2018).
4. *Cordyceps militaris* (кордицепс военный) — энтомопатогенный макромицет, культивируемый в странах Азии, обладающий высоким биотехнологическим и фармацевтическим потенциалом (Shrestha et al., 2012).
5. *Fistulina hepatica* (печёночница обыкновенная) — паразит древесных растений, преимущественно лиственных пород, широко употребляемый в пищу и известный своими высокими пищевыми качествами (Ribeiro et al., 2007) (Приложение 1, рис. 19).
6. *Flammulina rossica* (фламмулина русская) — как и более известный вид *F. Velutipes*, обладает высокими пищевыми качествами и является перспективным объектом для биотехнологических исследований (Park et al., 2019) (Приложение 1, рис. 20).
7. *Ganoderma lucidum* (лакированный трутовик) — широко промышленно культивируемый макромицет, известный как богатый источник ценных для фармацевтической промышленности биоактивных соединений (González et al., 2020; Hu et al., 2020) (Приложение 1, рис. 21).

8. *Hericium coralloides* (ежовик коралловидный) — съедобный макромицет, известный своими пищевыми качествами и биотехнологическим потенциалом (Kim et al., 2018) (Приложение 1, рис. 22).
9. *Hericium erinaceus* (ежовик гребенчатый) — широко культивируемый в пищевой промышленности макромицет. Является продуцентом активных соединений, имеющих большой фармацевтический потенциал (Liu et al., 2015; Li et al., 2018).
10. *Hericium flagellum* (ежовик альпийский) — ксилосапротрофный макромицет, являющийся перспективным объектом для биохимических исследований (Li et al., 2018).
11. *Lentinula edodes* (сии-такэ) — активно культивируемый макромицет, с характерными высокими пищевыми качествами и высоким биотехнологическим потенциалом (Finimundy et al., 2014) (Приложение 1, рис. 24).
12. *Lycoperdon pyriforme* (дождевик грушевидный) — съедобный гастероидный макромицет, перспективный объектом для биотехнологических исследований (Nedele et al., 2021) (Приложение 1, рис. 25).
13. *Mycetinis alliaceus* (чесночник большой) — съедобный макромицет, известный своими специфическими пищевыми характеристиками, обладающий большим биотехнологическим потенциалом как источник биоактивных соединений (Rapior et al., 1997).
14. *Mycoleptodonoides vassiljevae* (миколептодоноидес Васильевой) — слабо изученный макромицет, близкий к *M. Aitchisonii* (Berk.) Maas Geest., известному продуценту активных соединений.
15. *Phallus impudicus* (весёлка обыкновенная) — гастероидный макромицет, известный как продуцент биоактивных соединений, представляющий интерес как объект для биотехнологических исследований (Borg-Karlson et al., 1994) (Приложение 1, рис. 27).

16. *Pleurotus citrinopileatus* (вешенка лимонная) — культивируемый макромицет, с высокими пищевыми качествами, также являющийся продуцентом различных биоактивных соединений (Hu et al., 2006).
17. *Pleurotus nebrodensis* — ограниченно культивируемый в странах Азии вид, известный своими высокими пищевыми качествами, обладающий высоким потенциалом для биотехнологических исследований (Lv et al., 2009).
18. *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная) — широко известный культивируемый макромицет, обладающий высокими вкусовыми и товарными качествами. Также известен как продуцент ценных активных соединений (Ma et al., 2014) (Приложение 1, рис. 28).
19. *Sarcosoma globosum* (саркосома шаровидная) — сапротрофный аскомицет, известный в народной медицине, но на данный момент остающийся сравнительно слабо изученным. Потенциально является перспективным объектом для биотехнологических исследований (Perevedentseva, 2013).
20. *Sparassis latifolia* — как и более известный *S. Crispa*, культивируется в странах Азии, является объектом для биотехнологических исследований (Duan, Yu, 2019).

2.2 Методы хранения штаммов коллекции

Для оценки влияния различных методов хранения чистых культур на жизнеспособность макромицетов, отобранные штаммы рабочей коллекции были помещены на хранение следующими способами:

1. Хранение методом серийных пересевов (субкультивирование);
2. Хранение под слоем дистиллированной воды;
3. Хранение в замороженном состоянии (криохранение):
 - 3.1 Хранение на «агаровых блоках» (Hwang, 1960);
 - 3.2 Хранение по «перлитовому протоколу» (Homolka et al., 2001);
 - 3.3 Хранение по «зерновому протоколу» (Colauto et al., 2011).

Были выбраны как общепринятые методы хранения, широко применяемые в отечественных и зарубежных коллекциях штаммов, так и модифицированные протоколы. К первым относили субкультивирование, хранение под слоем дистиллированной воды и криохранение с использованием «агаровых блоков». Модифицированные методы включают хранение в сублимированном состоянии, «перлитовый протокол» и «зерновой протокол». Замораживание культур осуществляли с использованием следующих криопротекторов: 10 % раствор глицерина, 10 % раствор трегалозы и комбинация 10 % растворов глицерина и трегалозы в соотношении 1:1. Заморозку культур во всех протоколах криохранения осуществляли при помощи контейнера Nalgene Mr. Frosty Cryo (производства Thermo Scientific), обеспечивающего плавное понижение температуры со скоростью $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, принятой как оптимальной для сохранения жизнеспособности клеточного материала различного происхождения. Все опыты проводили в пятикратной повторности. Для всех протоколов период хранения составил 8 месяцев.

Хранение на агаризованных средах проводили на пробирках со скошенной агаризованной средой № 337. Инокулированные пробирки инкубировали при $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$. По завершению зарастания среды мицелием пробирки переносили в холодильную камеру ($+5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Каждые 2 месяца проводили пересев на новые пробирки.

Хранение под слоем дистиллированной воды осуществляли путём помещения блоков агаризованной среды № 337 с мицелием исследуемых штаммов под слой дистиллированной воды в полипропиленовых пробирках объёмом 2 мл с дальнейшим хранением при +5 °С.

Хранение в сублимированном состоянии проводили по протоколу, предложенному Сундари и Адоли (Sundari, Adholeya, 2000a). Метод сублимационной сушки включает в себя следующие этапы:

1. Помещённое в полипропиленовые пробирки типа Falcon отваренное зерно пшеницы подвергали дробной стерилизации в автоклаве (1 атм, 30 мин).
2. После инокулирования зерна мицелием исследуемых штаммов пробирки инкубировали при +25 °С в течение 14 суток.
3. Полученный зерновой мицелий переносили в стерильные полипропиленовые пробирки и покрывали слоем 10 % растворов криопротекторных соединений.
4. Через 1 час после этого проводили замораживание пробирок (–20 °С) и сублимацию. Высушивание образцов осуществляли при –40 °С в течение 48 часов.
5. По окончании процесса высушивания, пробирки помещали на хранение при +5 °С.

Проводили посев через 24 часа после процесса сублимационной сушки (т.н. «контроль закладки») и через 8 месяцев хранения. Для восстановления сублимированного зернового мицелия применяли стерильную дистиллированную воду. После 10 минут регидратации при комнатной температуре зерновой мицелий переносили на поверхность агаризованной среды № 337. Важным отличием приведённого метода сублимационной сушки от общепринятых протоколов, подразумевающих применение блоков агаризованной среды и молочной сыворотки, является использование зерна пшеницы в качестве субстрат-носителя мицелия и растворов криопротекторных соединений в дистиллированной воде.

Для криохранения культур методом «агаровых блоков» был выбран следующий вариант данного протокола, включающая в себя помещение блоков агаризованной среды с мицелием изучаемого штамма в стерильные криопробирки и внесение раствора криопротектора. После добавления раствора КПС проводили инкубацию криопробирок при комнатной температуре в течение 1 часа, что необходимо для проникновения криопротектора внутрь клеток, и замораживание (Hwang, 1968).

«Перлитовый протокол» подразумевает использование вспененного перлита в качестве субстрата-носителя. Перлит покрывают слоем жидкой питательной среды с добавлением криопротекторных соединений (Homolka et al., 2001; Homolka et al., 2007). В работе применяли модифицированный протокол, включающий следующие этапы:

1. В полипропиленовые криопробирки объёмом 2 мл вносили измельчённый вспененный перлит так, чтобы он занимал не более 2/3 объёма пробирки. Затем, криопробирки с перлитом стерилизовали в автоклаве (1 атм., 30 мин).
2. Жидкую питательную среду № 337 и растворы криопротекторов подвергали стерилизации в автоклаве (1 атм, 30 мин) и дальнейшему асептическому смешиванию непосредственно перед внесением в перлит, получая таким образом жидкую фракцию.
3. Проводили внесение жидкой питательной в криопробирки с вспененным перлитом и инокуляцию полученного субстрата агаровым блоком с мицелием изучаемого штамма. Крышки криопробирок оставляли приоткрытыми, края резьбы заматывали парафильмом для обеспечения газообмена и предотвращения контаминации. Криопробирки помещали в термостатируемые камеры на 14 суток (+25 °C).
4. На 7 сутки инкубации, проводили рыхление субстрата-носителя и его перемешивание стерильной препаровальной иглой. При

необходимости, субстрат дополнительно смачивали жидкой фракцией.

5. По окончании периода инкубации, осуществляли внесение дополнительного объёма 10 % раствора криопротектора, после чего криопробирки закрывали и переносили в морозильную камеру (–80 °C).

На 4 этапе была применена разработанная нами модификация, включающая в себя рыхление субстрата и внесение дополнительного объёма питательной среды для более быстрого зарастания всего объёма субстрата-носителя.

«Зерновой протокол» включает в себя использование органического субстрата-носителя — варёные зёрна пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Непосредственно замораживанию подвергается зерновой мицелий — зёрна пшеницы с развившимся на них мицелием. Протокол включает в себя следующие этапы (Bertéli et al., 2022):

1. Зерно пшеницы отваривали и помещали в полипропиленовые пробирки с завинчивающейся крышкой объёмом 50 мл типа Falcon. Пробирки подвергали дробной стерилизации: два последовательных автоклавирования с разницей в 24 часа при давлении 1 атм в течение 30 мин. После остывания, субстрат инокулировали блоками агаризованной среды с развившимся мицелием и переносили в термостатируемую камеру (+25 °C).
2. Осуществляли стерилизацию 10 % растворов криопротекторных соединений и полипропиленовых криопробирок объёмом 2 мл.
3. После зарастания всего объёма зёрен, проводили их внесение в стерильные криопробирки с дальнейшим добавлением стерильных растворов криопротекторов.
4. Через час после внесения растворов криопротекторов, криопробирки переносили в морозильную установку (–80 °C).

2.3 Морфолого-культуральные характеристики исследуемых штаммов

Хранение чистых культур могут оказывать сильное влияние на ряд морфолого-культуральных характеристик (Humber, 1997). Для исследования влияния хранения на морфолого-культуральные характеристики культур макромицетов проводили изучение внешней морфологии колоний, микроморфологии мицелия и числа пряжек до и после периода хранения.

По окончании срока хранения культуры штаммов изымали с хранения и проводили посев на чашки Петри со средой № 337. Чашки Петри инкубировали при +25 °С в течение 21 суток.

На 10 сутки после начала инкубации, фиксировали морфолого-культуральные характеристики — тип колонии, характер края колонии, окраска аверса и реверса колонии, наличие или отсутствие концентрической зональности, наличие секторов (Stalpers, 1978; Бухало, 1988). Для анализа микроморфологии проводили микроскопирование препаратов мицелия, полученного путём соскоба с поверхности колонии и переноса полученной биомассы в каплю 80 % раствора молочной кислоты на поверхности предметного стекла (Литвинов, 1969).

Анализ микроморфологии включал в себя подсчёт количества пряжек на одной гифе на участке длиной 500 мкм при увеличении $\times 1000$ (увеличение объектива — $\times 100$; увеличение окуляра — $\times 10$) (Дудка и др., 1982; Камзолкина, Богданов, 2017). Изучение микроморфологических характеристик проводили с использованием микроскопа Leica DM500 в двадцатикратной повторности.

2.4 Физиологические характеристики исследуемых штаммов

Помимо морфолого-культуральных характеристик, хранение культур оказывает сильное влияние на их физиологические характеристики (Borman et al., 2006). После изъятия с хранения и последующего посева на чашки Петри со средой № 337, культуры инкубировали при +25 °С в течение 21 суток. В процессе инкубации, измеряли диаметры колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях каждые 24 часа (Burnett, 1976). На 10 сутки проводили итоговый замер и сравнение значений диаметра колоний с контрольными значениями. В качестве контроля использовали данные о диаметре колоний исследуемых штаммов, полученные для первых пассажей после изоляции на 14 сутки инкубации при + 25 °С.

Подсчёт ростового коэффициента (РК) осуществляли по формуле: $РК = \frac{dgh}{n}$, где d — диаметр колонии в мм, h — высота мицелия в мм, g — плотность мицелия по трехбалльной шкале (1 — редкий, 2 — средняя плотность, 3 — плотный), n — возраст колонии (сутки). Ростовый коэффициент позволяет сравнивать рост культур разного возраста и с разной текстурой колоний, учитывая линейную скорость роста и интенсивность накопления биомассы. По ростовому коэффициенту штаммы условно разделяют на 3 группы: быстрорастущие (РК более 100), растущие со средней скоростью (РК от 50 до 100) и медленно растущие (РК менее 50) (Бухало, 1988).

2.5 Эндоглюканазная активность штаммов макромицетов

Созданная коллекция включает штаммы как ксилотрофных, сапротрофных и паразитических макромицетов, обладающих сложным ферментативным комплексом, позволяющим разрушать широкий спектр субстратов растительного происхождения (Baldrian, 2008a). Основным компонентом растительных клеточных стенок является целлюлоза, за разрушение которой у макромицетов отвечает целлюлазный ферментативный комплекс (Baldrian, Valášková, 2008). Для ферментов, входящих в состав целлюлазного ферментативного комплекса, характерна чёткая специализация (Синицын и др., 1995):

3. Эндоглюканызы гидролизуют внутренние гликозидные связи между моносакхаридными остатками;
4. Экзоглюканызы (целлобиогидролазы) расщепляют внешние гликозидные связи, расположенные на концах молекулы целлюлозы;
5. β -глюкозидазы разрушают гликозидные связи ди- и олигосахаридов.

Эндоглюканызы играют важнейшую роль в процессе деградации целлюлозы, первыми вступая в процесс гидролиза полимерной цепи. Воздействие эндоглюканызов выражается в значительном снижении степени полимеризации субстрата, что связано с фрагментацией этого субстрата, формированием моно-, ди- и трисахаридов. Учитывая тот факт, что целлюлоза является одним из основных источников питательных соединений, изучение влияния хранения на активность целлюлазного ферментативного комплекса, представляется особенно актуальным.

Для измерения эндоглюканызной активности отобранных штаммов применяли динитросалициловый метод — метод расчёта по восстанавливающим сахарам, образующимся в результате ферментативной реакции (Синицын и др., 1995). Данный метод включает в себя применение растворимой в воде натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в качестве субстрата. Использование КМЦ позволяет измерить активность только эндоглюканызов, поскольку целлобиогидролазы в силу особенностей строения их активного центра неспособны эффективно гидролизовать КМЦ из-за наличия у неё

карбоксиметильных групп. Измерение эндоглюканазной активности исследуемых штаммов мы проводили согласно методике Антроповой с соавторами (Антропова и др., 2015).

Жидкую среду Гетчинсона готовили с использованием микрокристаллической целлюлозы для тонкослойной хроматографии (Chemapol, Чехословакия) в качестве источника углеродного питания. Качалочные колбы Эрленмейера со средой Гетчинсона инокулировали изъятymi с хранения культурами исследуемых штаммов. Колбы инкубировали на качалке (180 об./мин.) при температуре +25 °С в течение 7 суток, для быстрорастущих штаммов, и 14 суток для медленно растущих. Для определения эндоглюканазной активности использовали химически чистую КМЦ средней вязкости. Спектрофотометрическое исследование проводили при помощи спектрофотометра В-1100 (ЭКОВЬЮ, Китай). Эндоглюканазную активность измеряли в единицах активности (ед.). Одна единица активности соответствует такому количеству фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль восстанавливающих сахаров в глюкозном эквиваленте за 1 минуту при +50 °С и рН 5,0.

2.6 Статистическая обработка данных

Помещение штаммов на хранение по вышеуказанным методам проводили в пятикратной повторности с обязательным «контролем закладки» через 24 часа. Фиксирование морфолого-культуральных и физиологических характеристик также проводили в пятикратной повторности. В трёхкратной повторности осуществляли измерение эндоглиюканазной активности штаммов.

Статистическую обработку полученных данных проводили в пакете программ Statistica 12.0. Осуществляли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с предварительным тестированием выборок на однородность (тест Левена). Для получения более подробных сведений о различиях между выборками проводили апостериорный анализ данных по методу Ньюмена-Кейлса и по методу Тьюки (уровень вероятности $P = 0,95$) (Newman, 1939; Tukey, 1949; Keuls, 1952).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методы хранения оказывают различное влияние на жизнеспособность и физиологию чистых культур макромицетов. Для сравнительного изучения используемых методов хранения были выбраны следующие параметры: жизнеспособность чистых культур, морфолого-культуральные (тип колонии, тип края колонии, количество пряжек на длину гиф, наличие анаморф и других структур), физиологические (диаметр колоний на 10 сутки, ростовой коэффициент) и биохимические (активность эндоглюканаз) характеристики штаммов. В ходе исследования было изучено 1780 образцов.

3.1 Жизнеспособность штаммов при использованных методах хранения

Известно, что выбранные методы хранения изначально были разработаны для видов микромицетов, способных к формированию бесполого спороношения и различных покоящихся стадий, крайне устойчивых к неблагоприятным условиям окружающей среды. Образование покоящихся стадий в культуре характерно только для ограниченного числа видов макромицетов. В связи с этим, общепринятые методы хранения не всегда оказываются оптимальными для культур макромицетов, приводя к их гибели.

Все отобранные штаммы сохранили свою жизнеспособность в процессе хранения на агаризованных средах как методом серийных пересевов, так и под слоем дистиллированной воды (табл. 2). Сохранение жизнеспособности культур при хранении на агаризованных среды было показано в ряде работ (Ellis, 1979; Croan et al., 1999; Richter et al., 2010). В частности, для штаммов *L. edodes* и *P. ostreatus*, было отмечено успешное восстановление культуры после хранения под слоем дистиллированной воды в течение 20 лет (Richter et al., 2016).

Применение методов сублимации показало, что макромицеты способны, при соблюдении ряда условий, переживать хранение в высушенном состоянии. Так, подобное было ранее показано для *Schizophyllum commune* Fr., видов рода *Coprinus*, *Laccaria* и др. (Tan et al., 1991; Sundari, Adholeya, 1999; Sundari, Adholeya, 2000a).

Таблица 2. Жизнеспособность штаммов макромицетов после периода хранения.

№	Вид	Жизнеспособность после хранения											
		СП	ДВ	С У Б	АБ			ПП			ЗП		
					Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы													
PR58	<i>A. bisporus</i>	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+	++ ¹	++
RA01	<i>M. alliaceus</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	—	+	+	+
RA02	<i>P. impudicus</i>	+	+	н/д	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MR61	<i>S. globosum</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ксилосапротрофы													
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+	+
FE25	<i>A. nigricans</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MR55	<i>F. rossica</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MR40	<i>G. lucidum</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	++	+	+	+
MR57	<i>H. coralloides</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	—	+	++	+
FE53	<i>H. erinaceus</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RA09	<i>H. flagellum</i>	+	+	н/д	—	—	—	—	+	—	—	—	—
FE20	<i>L. edodes</i>	+	+	н/д	+	+	+	—	+	+	+	+	+
RA03	<i>L. pyriforme</i>	+	+	н/д	+	+	+	—	+	—	+	+	+
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	+	+	н/д	++	++	++	+	+	—	+	+	+
MR1	<i>P. ostreatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Паразиты древесных растений													
RA04	<i>F. hepatica</i>	+	+	н/д	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FE30	<i>S. latifolia</i>	+	+	н/д	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Паразиты насекомых													
MR67	<i>C. militaris</i>	+	+	н/д	—	—	—	+	+	+	+	+	+

Прим. Г — 10 % раствор глицерина, Т — 10 % раствор трегалозы, Г+Т — смесь 10 % растворов глицерина и трегалозы. ¹ — увеличение диаметра колонии после изъятия с хранения

Была показана неоптимальность протоколов криохранения в отношении культур паразитов высших растений и штамма *Phallus impudicus*, гумусового сапротрофа. Подобное можно объяснить трофическими особенностями паразитов высших растений и индивидуальными характеристиками штаммов. Выявлено, что протокол с использованием блоков агаризованной среды, традиционно применяемый для хранения макро- и микромицетов, показал худшие показатели по сохранению жизнеспособности исследованных чистых культур. Гибель

культур в процессе криохранения по данному протоколу отмечали в ряде исследований (Danell, Flygh, 2002; Crahay et al., 2013; Sato et al., 2019).

Применение модифицированных «перлитового» и «зернового» протоколов криохранения позволило сохранить в жизнеспособном состоянии большинство исследуемых штаммов, в редких случаях (*A. bisporus*, *G. lucidum*, *H. coralloides*) ускоряя рост колоний. Сходные результаты были показаны для *G. lucidum*, *L. edodes*, *P. citrinopileatus* (Mata, Pérez-Merlo, 2003; Homolka et al., 2006).

Из выбранных протоколов хранения только метод серийных пересевов и метод хранения под слоем дистиллированной воды позволили сохранить жизнеспособность всех штаммов рабочей коллекции. Из протоколов криохранения оптимальными были «зерновой протокол» и «перлитовый протокол». Метод «агаровых блоков» показал худшие результаты. Тем не менее, целесообразным представляется расширение списка исследованных штаммов и оптимизация применяемых протоколов, использование других криопротекторных соединений и их концентраций.

3.2 Морфолого-культуральные характеристики штаммов

К изучаемым морфолого-культуральным характеристикам штаммов относили: тип колонии, тип края колонии, окраска аверса и реверса, число пряжек на длину гифы, наличие анаморф и других микроскопических структур. Данные характеристики были выбраны в связи с тем, что они позволяют с достаточной простотой оценить состояние колонии и являются стандартными при проведении исследований морфолого-культуральных особенностей (Бухало, 1988).

Среди отобранных штаммов были отмечены следующие типы колоний (по Stalpers, 1978) (табл. 3): войлочный (felty), перистый (plumose), плёночный или субвойлочный (pellicular or subfelty), хлопковый (cottony), шерстистый (woolly).

Таблица 3. Типы колоний исследуемых штаммов.

Тип колоний	Штаммы	Внешний вид колоний
Войлочный (felty)	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Cordyceps militaris</i> <i>Flammulina rossica</i>	
Перистый (plumose)	<i>Hericium erinaceus</i> <i>Hericium coralloides</i> <i>H. flagellum</i> <i>Phallus impudicus</i> <i>Sarcosoma globosum</i>	

Плёночный (субвойлочный) (pellicular or subfelty)	<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Mycetinis alliaceus</i> <i>Mycoleptodonoides</i> <i>vassiljevae</i>	
Хлопковый (cottony)	<i>Auricularia auricula-judae</i> <i>Agaricus bisporus</i> <i>A. nigricans</i> <i>Pleurotus citrinopileatus</i> <i>P. nebrodensis</i>	
Шерстистый (woolly)	<i>Lentinula edodes</i> <i>Fistulina hepatica</i> <i>Lycoperdon pyriforme</i> <i>Sparassis latifolia</i>	

Изменение типа колонии после изъятия с хранения наблюдали у штамма *Pleurotus ostreatus* (см. Приложение 4). Для штаммов фиксировали изменение выраженности воздушного мицелия, характера края колонии и изменение количества пряжек. Отмечали пряжки различных форм и размеров, с пространством между пряжкой и гифой (т.н. «medallion clamps») (Stalpers, 1978) (рис. 7–10). Наиболее часто встречали обычные пряжки («regular clamps») (рис. 7). Реже — пряжки «медальонного типа» различных форм (рис. 8, 9), в том числе с латеральными гифами (рис. 10).



Рис. 7. Пряжки на гифах *Hericium coralloides* после хранения по методу «агаровых блоков».

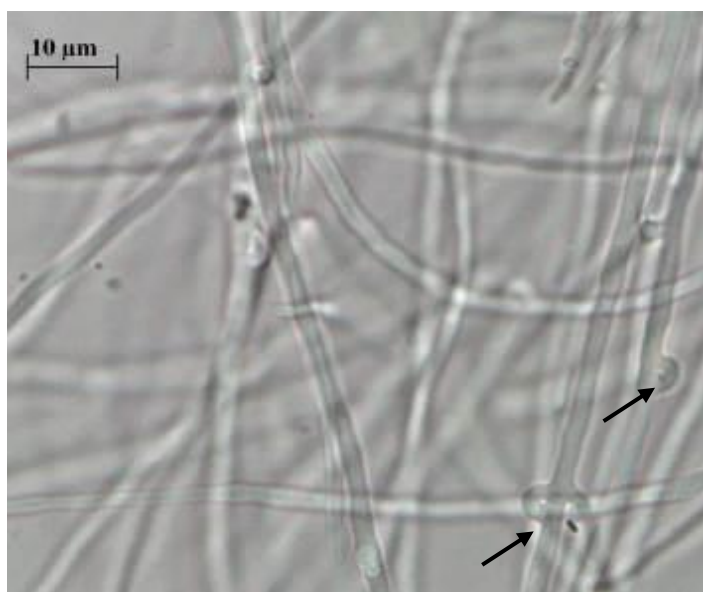


Рис. 8. «Медальонные пряжки» на гифах *Lentinula edodes* после хранения по методу «агаровых блоков».



Рис. 9. «Медальонные пряжки» на гифах *Sparassis latifolia* после хранения под слоем дистиллированной воды.

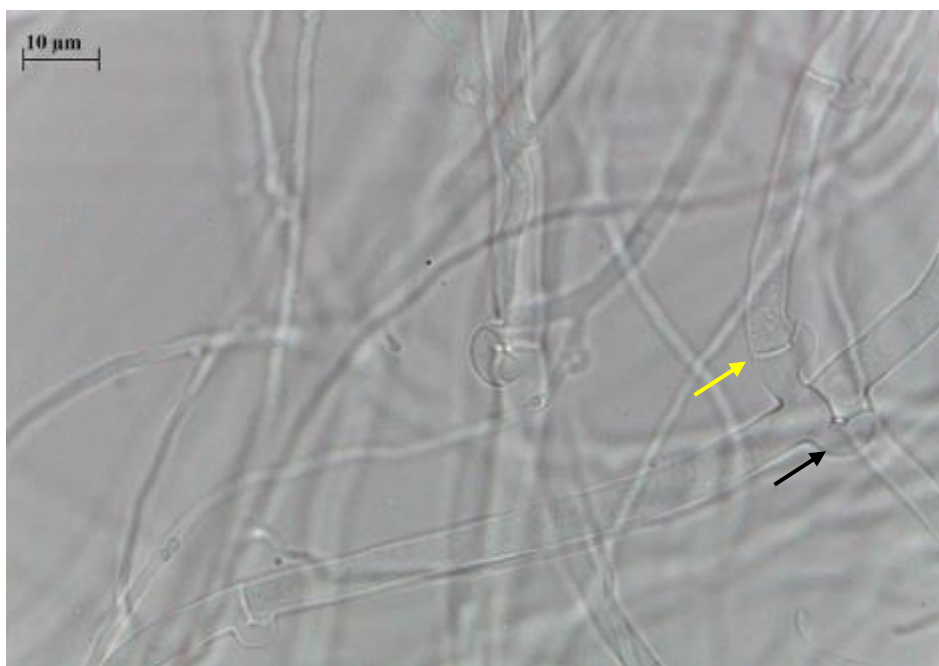


Рис. 10. «Медальонные пряжки» на гифах *Flammulina rossica* после хранения под слоем дистиллированной воды. Желтой стрелкой отмечена латеральная гифа.

3.2.1 Хранение на агаризованных средах

Для культур, помещённых на хранение методом серийных пересевов и под слой дистиллированной воды, отмечали слабое развитие воздушного мицелия и снижение плотности колоний. Хранение данными методами также оказывало влияние на число пряжек на мицелии, приводя к его снижению, что было более выражено для культур, претерпевавших серийные пересевы. Для *P. impudicus* наблюдали полную утрату пряжек (табл. 4).

Таблица 4. Среднее количество мицелиальных пряжек на длине гифы 500 мкм, после периода хранения согласно выбранным протоколам (увеличение $\times 1000$).

№	Вид	Среднее число мицелиальных пряжек						
		К	СП	ДВ	СУБ	АБ	ПП	ЗП
Гумусовые сапротрофы								
PR58	<i>A. bisporus</i>	—	—	—	—	—	—	—
RA01	<i>M. alliaceus</i>	3	2	2	н/д	2	4	3
RA02	<i>P. impudicus</i>	1	—	1	н/д	—	—	—
Ксилосапротрофы								
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	2	1	1	—	1	2	2
FE25	<i>A. nigricans</i>	1	1	2	н/д	—	1	1
MR55	<i>F. rossica</i>	5	1	2	1	2	4	5
MR40	<i>G. lucidum</i>	5	2	4	н/д	5	4	5
MR57	<i>H. coralloides</i>	8	2	3	н/д	3	5	6
FE53	<i>H. erinaceus</i>	4	3	5	н/д	4	4	7
RA09	<i>H. flagellum</i>	5	4	5	н/д	—	4	—
FE20	<i>L. edodes</i>	4	2	4	н/д	2	2	3
RA03	<i>L. pyriforme</i>	2	1	1	н/д	1	1	1
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	2	1	2	н/д	—	—	—
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	5	2	3	н/д	3	4	5
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	3	3	4	н/д	7	5	5
MR1	<i>P. ostreatus</i>	7	3	3	2	3	4	8
Паразиты высших растений								
RA04	<i>F. hepatica</i>	3	3	3	н/д	—	—	—
FE30	<i>S. latifolia</i>	7	6	8	н/д	—	—	—

Примечание: К — контроль, СП — серийные пересевы, ДВ — дистиллированная вода, СУБ — сублимационная сушка, АБ — агаровые блоки, ПП — «перлитовый протокол», ЗП — «зерновой протокол».

3.2.2 Хранение в сублимированном состоянии

Среди штаммов, помещённых на хранение в сублимированном состоянии (*A. bisporus*, *A. auricula-judae*, *F. rossica*, *P. ostreatus*), высушивание в вакууме пережили все штаммы, кроме *A. bisporus*. Для культур отмечали слабое развитие воздушного мицелия (*A. auricula-judae*, *F. rossica*) или почти полное его отсутствие (*P. ostreatus*) и низкую плотность колоний (рис. 11–13). Для колоний *A. auricula-judae* и *P. ostreatus* было показано развитие колоний по шерстистому (woolly) типу, в отличие от войлочного типа, характерного для контроля. Фиксировали значительное падение числа пряжек (*F. rossica*) или их полную утрату (*P. ostreatus*) (табл. 4).



Рис. 11. Колонии *A. auricula-judae* после хранения в сублимированном состоянии.



Рис. 12. Колонии *F. rossica* после хранения в сублимированном состоянии.



Рис. 13. Колонии *P. ostreatus* после хранения в сублимированном состоянии.

3.2.3 Криохранение. Метод «агаровых блоков»

Хранение в замороженном состоянии оказывало негативное влияние на морфологию колоний и число пряжек на мицелии. Тип колонии и её края оставался неизменным, за исключением штамма *P. ostreatus*, для которого были зафиксированы колонии перистого (plumose) типа, с более редким и менее плотным воздушным мицелием (рис. 14, 15). Большинство исследуемых штаммов, помещённых на хранение согласно данному протоколу, продемонстрировали более активное развитие стелющегося по поверхности субстрата мицелия, т.н. поисковых гиф. Усиленное развитие стелющегося мицелия может свидетельствовать о том, что при воздействии стрессовых условий, культура стремится быстрее освоить субстрат за счёт более сильного развития поисковых гиф. Применение протокола с блоками агаризованной среды приводило к слабому развитию воздушного мицелия и уменьшению числа пряжек у большинства штаммов или их полной утрате (у *A. nigricans* и *M. vassiljevae*). Тем не менее, отмечали и обратный эффект. Так, для культур *P. nebrodensis* было зафиксировано увеличение числа пряжек.

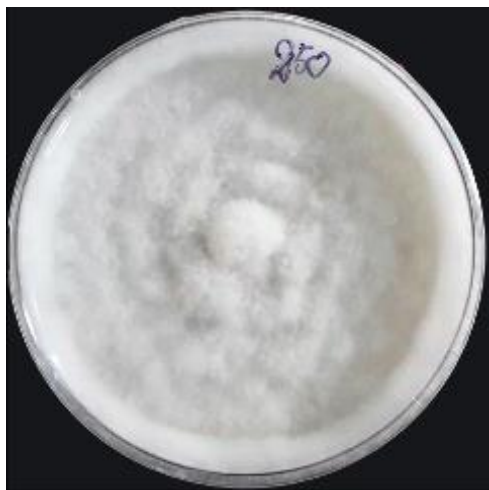


Рис. 14. Колония *P. ostreatus* до помещения на криохранение.



Рис. 15. Колония *P. ostreatus* после криохранения на агаризованных блоках.

3.2.4 Криохраниение. «Перлитовый протокол»

В отличие от протокола с «агаровыми блоками», культуры, помещённые на хранение по «перлитовому протоколу», не демонстрировали уменьшения развития воздушного мицелия, хотя отмечали более слабую концентричность мицелия (рис. 10, 12). Было зафиксировано уменьшение числа пряжек (табл. 3).



Рис. 16. Колония *P. ostreatus* после криохраниения по «перлитовому протоколу».

3.2.5 Крíoхранение. «Зерновой протокол»

Наименьшее влияние на морфологию культур оказало хранение по «зерновому протоколу». Вместе с этим, отмечали увеличение числа пряжек для культур *H. erinaceus* и *P. nebrodensis*. Также, на мицелии *H. erinaceus* фиксировали формирование единичных хламидоспор, позволяющих переживать неблагоприятные условия окружающей среды (рис. 12).



Рис. 17. Гифы *Hericium erinaceus* с развившимися пряжками (отмечена жёлтым) и хламидоспорой (отмечена красным).

Все методы хранения оказывали влияние на морфолого-культуральные характеристики штаммов макромицетов. Так, наблюдали снижение числа пряжек на длину гифы, более слабое развитие воздушного мицелия и снижение плотности колоний. Было зафиксировано развитие структур бесполого размножения (хламидоспор), формирование которых часто связано с воздействием стрессовых условий (Liu et al., 2020). Были зарегистрированы пять типов колоний. Изменение типа колонии после периода хранения было в единичных случаях. При этом, отмечали слабую выраженность концентричности мицелия. Тип края колонии и окраска аверса и реверса оставались неизменными.

Необходимо отметить, что культуры большинства штаммов, которые были заморожены по «зерновому протоколу», продемонстрировали наиболее близкое к

контролю количество пряжек, в ряде случаев превышая контрольные значения. Увеличение числа пряжек можно связать с тем, что амилоза, амилопектин и их мономер, глюкоза, которыми богат эндосперм зёрен пшеницы, являются не только природными стабилизаторами, связывающими молекулы воды, играя роль криопротекторных соединений, но и служат дополнительным источником питания для мицелия гриба. Зерно пшеницы является источником ряда микроэлементов и аминокислот, оказывающих благотворное влияние на развитие мицелия. Также, это может быть связано с индивидуальными особенностями штаммов. Так, *Lycoperdon pyriforme* демонстрировал формирование единичных пряжек на мицелии. Как известно, у многих видов гастероидных макромицетов мицелиальные пряжки на дикариотическом мицелии, как правило, отсутствуют или они единичны (Dowding, Bulmer, 1964; Huss, 1996). При этом, наличие или отсутствие пряжек может быть штаммоспецифичным (Duncan, Keay, 1990).

3.3 Физиологические характеристики штаммов

Помимо морфолого-культуральных характеристик, общепринятыми параметрами для изучения влияния тех или иных условий на чистые культуры являются физиологические характеристики — диаметр колоний на установленные сутки и ростовой коэффициент.

3.3.1 Серийные пересевы

Наблюдали слабое (< 1 мм/сут) замедление роста колоний и снижение значений ростового коэффициента по сравнению с контролем (табл. 5, 6). Вместе с этим, была отмечена, лаг-фаза длительностью в 1–2 суток. Особенно характерно это было для штаммов видов *A. bisporus*, *A. auricula-judae*, *C. militaris*, *H. flagellum*, *M. alliaceus*, *P. nebrodensis*, *P. ostreatus*, *S. globosum*. В то же время, отдельные штаммы, такие как *F. hepatica*, *L. edodes*, *L. pyriforme*, *P. impudicus*, *S. latifolia*, не показали подобных изменений. Замедление роста колоний и снижение значений ростовых коэффициентов может быть связано с использованием неоптимальных питательных сред и постепенным старением культур.

Таблица 5. Средние значения диаметров колоний штаммов после периода хранения (на 10 сутки).

№	Вид	Средний диаметр колоний, мм	
		К	СП
Гумусовые сапротрофы			
PR58	<i>A. bisporus</i>	18,9±0,42*	16,4±0,38
RA01	<i>M. alliaceus</i>	23,3±0,2	19,8±0,25
RA02	<i>P. impudicus</i>	16,3±0,12	16,2±0,12
MR61	<i>S. globosum</i>	29,3±0,12	26,3±0,12
Ксилосапротрофы			
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	41,2±0,05	36,1±0,04
FE25	<i>A. nigricans</i>	38,8±0,04	35,6±0,1
MR55	<i>F. rossica</i>	49,6±0,02	48,3±0,02
MR40	<i>G. lucidum</i>	33,1±0,1	29,8±0,13
MR57	<i>H. coralloides</i>	42,6±0,5	41±0,16
FE53	<i>H. erinaceus</i>	37,8±0,13	35,8±0,12
RA09	<i>H. flagellum</i>	19,4±0,18	16,9±0,1
FE20	<i>L. edodes</i>	31,7±0,2	31,3±0,2
RA03	<i>L. pyriforme</i>	20,5±0,22	19,8±0,12
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	49,9±0,33	48,4±0,19
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	48,3±0,25	48±0,15

PR62	<i>P. nebrodensis</i>	41,1±0,18	36,4±0,2
MR1	<i>P. ostreatus</i>	50,2±0,14	47,7±0,18
Паразиты древесных растений			
RA04	<i>F. hepatica</i>	6,7±0,1	6,5±0,1
FE30	<i>S. latifolia</i>	4,3±0,05	4,2±0,07
Паразиты насекомых			
MR67	<i>C. militaris</i>	30,4±0,22	19,5±0,2

Прим. К — контроль, СП — серийные пересевы. * — после «±» приведены значения стандартной ошибки среднего.

Таблица 6. Средние значения ростового коэффициента исследуемых штаммов после периода хранения.

№	Вид	Ростовой коэффициент	
		К	СП
Гумусовые сапротрофы			
PR58	<i>A. bisporus</i>	7,56±0,3	6,56±0,02
RA01	<i>M. alliaceus</i>	13,98±0,6	11,88±0,5
RA02	<i>P. impudicus</i>	3,26±0,17	3,24±0,43
MR61	<i>S. globosum</i>	8,79±0,56	7,89±0,29
Ксилосапротрофы			
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	37,08±1,07	21,66±0,55
FE25	<i>A. nigricans</i>	23,28±0,75	21,36±0,21
MR55	<i>F. rossica</i>	44,64±0,84	43,47±0,41
MR40	<i>G. lucidum</i>	19,86±0,43	17,88±0,37
MR57	<i>H. coralloides</i>	17,04±0,51	16,4±0,42
FE53	<i>H. erinaceus</i>	15,12±0,72	14,32±0,38
RA09	<i>H. flagellum</i>	7,76±0,2	6,76±0,33
FE20	<i>L. edodes</i>	19,02±0,43	12,52±0,25
RA03	<i>L. pyriforme</i>	4,1±0,16	3,96±0,12
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	29,94±0,71	29,04±0,54
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	43,37±2,73	43,2±1,1
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	36,99±2,1	21,84±1,3
MR1	<i>P. ostreatus</i>	75,3±3,2	42,93±2,1
Паразиты древесных растений			
RA04	<i>F. hepatica</i>	2,68±0,02	2,6±0,05
FE30	<i>S. latifolia</i>	1,2±0,02	1,1±0,07
Паразиты насекомых			
MR67	<i>C. militaris</i>	27,36±1,47	17,55±0,61

Прим. К — контроль, СП — серийные пересевы.

В ходе ряда исследований было выявлено, что хранение культур методом серийных пересевов может негативно влиять на их морфолого-культуральные и физиологические характеристики. В частности, наблюдается потеря мицелиальных структур, замедление роста и снижение вирулентности для

фитопатогенных и энтомопатогенных видов (Samšínáková, Kalalova, 1983; Humber, 1997; Borman et al., 2006; Sakurai et al., 2019). Помимо этого, хранение методом серийных пересевов характеризуется высокими трудозатратами, повышенной опасностью контаминации культур и необходимостью наличия больших объёмов свободного пространства для хранения носителей. В то же время, данный метод сравнительно дешёв и не высокотехнологичен, позволяет сохранять в жизнеспособном состоянии штаммы, для которых не подходит хранение другими способами (Humber, 1997). На данный момент, хранение методом серийных пересевов активно применяется в отечественных и зарубежных коллекциях чистых культур (Озерская и др., 2006; Псурцева, Кияшко, 2022).

3.3.2 Хранение под слоем дистиллированной воды

Все выбранные штаммы сохранили свою жизнеспособность при хранении по данному протоколу. Как и в случае с предыдущим методом хранения, для всех культур наблюдали лаг-фазу длительностью 1–2 суток. Тем не менее, для всех чистых культур отобранных штаммов наблюдали снижение значений исследуемых физиологических характеристик (табл. 7, 8). Вместе с методом серийных пересевов, хранение под слоем дистиллированной воды, был единственным протоколом, подходящим для штаммов видов *Fistulina hepatica* и *Phallus impudicus*. Замедление роста и уменьшение значений ростового коэффициента можно объяснить длительным хранением под слоем дистиллированной воды при низких температурах. Целесообразным представляется изучение процесса восстановления физиологических характеристик в последующих пассажах.

Таблица 7. Средние значения диаметров колоний штаммов после периода хранения (на 10 сутки).

№	Вид	Средний диаметр колоний, мм	
		К	ДВ
Гумусовые сапротрофы			
PR58	<i>Agaricus bisporus</i>	18,9±0,42	15,8±0,37
RA01	<i>Mycetinis alliaceus</i>	23,3±0,2	23,1±0,24
RA02	<i>Phallus impudicus</i>	16,3±0,12	15,1±0,15
MR61	<i>Sarcosoma globosum</i>	29,3±0,12	27,5±0,15
Ксилосапротрофы			
MR16	<i>Auricularia auricula-judae</i>	41,2±0,05	40,5±0,04
FE25	<i>Auricularia nigricans</i>	38,8±0,04	28,7±0,12
MR55	<i>Flammulina rossica</i>	49,6±0,02	49,8±0,03
MR40	<i>Ganoderma lucidum</i>	33,1±0,1	32,6±0,15
MR57	<i>Hericium coralloides</i>	42,6±0,5	42,1±0,18
FE53	<i>Hericium erinaceus</i>	37,8±0,13	37,1±0,2
RA09	<i>Hericium flagellum</i>	19,4±0,18	17,2±0,12
FE20	<i>Lentinula edodes</i>	31,7±0,2	31,6±0,19
RA03	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	20,5±0,22	16,6±0,18
FE34	<i>Mycoleptodonoides vassiljevae</i>	49,9±0,33	49,6±0,4
FE27	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	48,3±0,25	47,4±0,19
PR62	<i>Pleurotus nebrodensis</i>	41,1±0,18	37,6±0,14
MR1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	50,2±0,14	50,1±0,1
Паразиты древесных растений			
RA04	<i>Fistulina hepatica</i>	6,7±0,1	6,4±0,1
FE30	<i>Sparassis latifolia</i>	4,3±0,05	4,2±0,05
Паразиты насекомых			
MR67	<i>Cordyceps militaris</i>	30,4±0,22	29,5±0,18

Примечание: К — контроль, ДВ — дистиллированная вода.

Использование этого метода позволяет увеличить срок хранения и избежать частых пересевов на новые питательные среды, что позволяет в значительной степени снизить трудовые и временные затраты, а также вероятность контаминации культур. В ряде исследований была показана высокая эффективность хранения чистых культур представителей разных таксономических и эколого-трофических групп под слоем дистиллированной воды (Burdshall, Dorworth, 1994; Croan et al., 1999; Richter et al., 2010; Castro-Rios, Bermeo-Escobar, 2021). На сегодняшний день, хранение под слоем дистиллированной воды, наряду с методом серийных пересевов, широко

применяется в различных учебных и научных коллекциях (Озерская и др., 2006; Псурцева, Кияшко, 2022).

Таблица 8. Средние значения ростового коэффициента исследуемых штаммов после периода хранения.

№	Вид	Ростовой коэффициент	
		К	ДВ
Гумусовые сапротрофы			
PR58	<i>A. bisporus</i>	7,56±0,3	6,32±0,1
RA01	<i>M. alliaceus</i>	13,98±0,6	13,86±0,45
RA02	<i>P. impudicus</i>	3,26±0,17	3,02±0,23
MR61	<i>S. globosum</i>	8,79±0,56	8,25±0,51
Ксилосапротрофы			
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	37,08±1,07	36,45±0,87
FE25	<i>A. nigricans</i>	23,28±0,75	17,22±0,56
MR55	<i>F. rossica</i>	44,64±0,84	44,82±0,77
MR40	<i>G. lucidum</i>	19,86±0,43	19,56±0,21
MR57	<i>H. coralloides</i>	17,04±0,51	16,84±0,34
FE53	<i>H. erinaceus</i>	15,12±0,72	14,84±0,56
RA09	<i>H. flagellum</i>	7,76±0,2	6,88±0,31
FE20	<i>L. edodes</i>	19,02±0,43	18,96±0,27
RA03	<i>L. pyriforme</i>	4,1±0,16	3,32±0,1
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	29,94±0,71	29,76±1,1
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	43,37±2,73	42,66±1,43
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	36,99±2,1	22,6±2,25
MR1	<i>P. ostreatus</i>	75,3±3,2	60,12±2,89
Паразиты древесных растений			
RA04	<i>F. hepatica</i>	2,68±0,02	2,56±0,08
FE30	<i>S. latifolia</i>	1,2±0,02	0,84±0,05
Паразиты насекомых			
MR67	<i>C. militaris</i>	27,36±1,47	26,55±1,23

3.3.3 Хранение в сублимированном состоянии

Наблюдали сильное замедление роста колоний и снижение их плотности (табл. 9, 10). Помимо этого, отмечали наличие лаг-фазы длительностью 3 суток, что может быть связано с стрессовыми факторами нахождения в вакууме. Тем не менее, показано, что, при использовании модифицированных протоколов криохранения, штаммы макромицетов способны сохранять свою жизнеспособность и физиологические характеристики на приемлемом уровне.

Таблица 9. Средние значения диаметров колоний штаммов до и после периода хранения (на 10 сутки).

№	Вид	Средний диаметр колоний, мм	
		К	СУБ
PR58	<i>Agaricus bisporus</i>	18,9±0,42	—*
MR16	<i>Auricularia auricula-judae</i>	41,2±0,05	8,3±0,02
MR55	<i>Flammulina rossica</i>	49,6±0,02	21,2±0,04
MR1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	50,2±0,14	20,7±0,07

Прим. К — контроль, СУБ — хранение в сублимированном состоянии, * — гибель культуры.

Таблица 10. Средние значения ростового коэффициента (РК) исследуемых штаммов после периода хранения.

№	Вид	Ростовой коэффициент	
		К	СУБ
PR58	<i>Agaricus bisporus</i>	7,56±0,3	—
MR16	<i>Auricularia auricula-judae</i>	37,08±1,07	1,66±0,01
MR55	<i>Flammulina rossica</i>	44,64±0,84	8,48±0,23
MR1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	75,3±3,2	8,28±0,54

Прим. К — контроль, СУБ — хранение в сублимированном состоянии.

3.3.4 Криохранение. Протокол с использованием «агаровых блоков»

После 8-месячного хранения исследуемых штаммов по данному протоколу, было отмечено сильное замедление роста колоний и уменьшение значений ростовых коэффициентов (табл. 11, 12). Штаммы видов *Cordyceps militaris*, *Fistulina hepatica*, *Hericium flagellum*, *Phallus impudicus*, *Sparassis latifolia* не смогли сохранить свою жизнеспособность ни в одном из вариантов

криохранения. В то же время, культуры штамма *Auricularia auricula-judae* утратили свою жизнеспособность только в отдельных вариантах опыта по криохранению.

Таблица 11. Средние значения диаметров колоний штаммов после периода хранения (на 10 сутки).

Штамм	Вид	Средний диаметр колонии, мм			
		К	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы					
PR58	<i>A. bisporus</i>	18,9±0,42	2,1±0,11	3,4±0,22	2,2±0,21
RA01	<i>M. alliaceus</i>	23,3±0,2	12,2±0,1	13,2±0,2	12,4±0,2
MR61	<i>S. globosum</i>	29,3±0,12	17±0,21	16,9±0,2	17,3±0,2
Ксилосапротрофы					
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	41,2±0,05	–	9,4±0,14	–
FE25	<i>A. nigricans</i>	38,8±0,04	28,7±0,12	26,7±0,1	29,6±0,12
MR55	<i>F. rossica</i>	49,6±0,02	30,8±0,04	31,5±0,12	39,9±0,21
MR40	<i>G. lucidum</i>	33,1±0,1	32±0,08	23,4±0,12	20,4±0,14
MR57	<i>H. coralloides</i>	42,6±0,5	25,1±0,3	26,1±0,4	19,4±0,22
FE53	<i>H. erinaceus</i>	37,8±0,13	21,6±0,1	19,6±0,11	14,6±0,14
FE20	<i>L. edodes</i>	31,7±0,2	17,6±0,2	22,8±0,21	22±0,22
RA03	<i>L. pyriforme</i>	20,5±0,22	13,4±0,18	15,6±0,2	16,3±0,26
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	49,9±0,33	38,7±0,3	41,1±0,3	43,9±0,24
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	48,3±0,25	28,3±0,21	37,6±0,23	42,2±0,2
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	41,1±0,18	46,4±0,23	43,1±0,12	44,4±0,1
MR1	<i>P. ostreatus</i>	50,2±0,14	47,1±0,1	47,8±0,12	48,9±0,1

Прим. К — контроль, Г — 10 % раствор глицерина, Т — 10 % раствор трегалозы, ГТ — смесь 10 % растворов глицерина и трегалозы.

Использование 10 % раствора глицерина в качестве криопротекторного соединения позволило сохранить жизнеспособность почти всех штаммов, кроме штаммов *Auricularia auricula-judae*. Данный криопротектор был наиболее эффективен для штаммов видов *Auricularia nigricans*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus* и наименее — для включённых в рабочую коллекцию штаммов видов гумусовых сапротрофов. Помимо этого, было отмечено, что после хранения культуры *Pleurotus nebrodensis* демонстрировали более сильное развитие воздушного мицелия, увеличение значений РК при ускорении роста колонии. Возможно, это связано с тем, что штамм *P. nebrodensis* является промышленным и мог претерпеть ряд целенаправленных изменений, в том числе связанных с повышением его устойчивости к негативным факторам хранения в замороженном состоянии.

Применение 10 % раствора трегалозы позволило сохранить жизнеспособность всех исследуемых штаммов, за исключением указанных в начале. Следует отметить, что трегалоза была оптимальным криопротектором для штаммов видов, относящихся к эколого-трофической группе гумусовых сапротрофов. В то же время, культура штамма *Auricularia auricula-judae* смогла выжить только в данном варианте эксперимента.

Таблица 12. Средние значения ростового коэффициента (РК) исследуемых штаммов после периода хранения.

Штамм	Вид	Ростовой коэффициент			
		К	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы					
PR58	<i>A. bisporus</i>	7,56±0,3	0,21±0,01	0,68±0,02	0,44±0,02
RA01	<i>M. alliaceus</i>	13,98±0,6	2,44±0,12	5,28±0,15	4,96±0,19
MR61	<i>S. globosum</i>	8,79±0,56	3,4±0,2	5,07±0,21	3,46±0,18
Ксилосапротрофы					
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	37,08±1,07	–	3,76±0,22	–
FE25	<i>A. nigricans</i>	23,28±0,75	11,48±0,23	10,68±0,25	11,84±0,11
MR55	<i>F. rossica</i>	44,64±0,84	18,48±0,33	28,35±0,27	35,91±0,78
MR40	<i>G. lucidum</i>	19,86±0,43	19,2±0,12	9,36±0,11	8,16±0,07
MR57	<i>H. coralloides</i>	17,04±0,51	5,02±0,06	10,44±0,12	3,88±0,08
FE53	<i>H. erinaceus</i>	15,12±0,72	8,64±0,1	7,84±0,13	5,84±0,09
FE20	<i>L. edodes</i>	19,02±0,43	10,56±0,21	9,12±0,3	13,2±0,25
RA03	<i>L. pyriforme</i>	4,1±0,16	1,34±0,06	3,12±0,15	3,26±0,08
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	29,94±0,71	23,22±0,21	24,66±0,25	26,34±0,25
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	43,37±2,73	11,32±0,1	33,84±0,29	37,98±0,33
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	36,99±2,1	55,68±0,56	38,79±0,55	53,28±0,42
MR1	<i>P. ostreatus</i>	75,3±3,2	28,26±0,44	28,68±0,4	39,12±0,32

Прим. К — контроль, Г — 10 % раствор глицерина, Т — 10 % раствор трегалозы, ГТ — смесь 10 % растворов глицерина и трегалозы.

Использование смеси криопротекторов негативно сказывалось на характеристиках культур видов гумусовых сапротрофов. При этом, большинство ксилосапротрофных видов показывали наиболее близкие к контролю значения диаметров колоний и ростового коэффициента в варианте хранения с использованием смеси криопротекторов.

Протокол с использованием агаровых блоков нашел широкое применение во многих отечественных и зарубежных учебных и научных коллекциях благодаря своей относительной простоте и универсальности. Тем не менее, многие виды базидиальных макромицетов утрачивают жизнеспособность после

хранения по данному протоколу (Ito, Nakagiri, 1996; Danell, Flygh, 2002; Crahay et al., 2013; Sato et al., 2019).

3.3.5 Криохранение. «Перлитовый протокол»

После 8 месяцев хранения по «перлитовому протоколу» для большинства штаммов наблюдали замедление роста и снижение значений ростового коэффициента колоний, что можно объяснить стрессовым фактором длительного хранения в замороженном состоянии. Тем не менее, замедление роста было не таким сильным как в случае протокола с использованием «агаровых блоков» (табл. 13, 14). Подобный эффект отмечали для *Hericium coralloides*, *Mycoleptodonoides vassiljevae*, *Pleurotus citrinopileatus*, *P. ostreatus*. В то же время, для штамма вида *Lycoperdon pyriforme*, заложенного на хранение с добавлением 10 % раствора трегалозы, отмечали увеличение ростового коэффициента. Так, на 10 сутки инкубации, для штамма вида *Ganoderma lucidum*, помещённого на хранение в варианте с добавлением 10 % раствора глицерина и смеси 10 % растворов криопротекторов, отмечали больший, по сравнению с контролем, диаметр колоний, что может быть связано с использованием мицелием гриба излишков трегалозы и глицерина как дополнительных источников питания, а также индивидуальными характеристиками штамма (табл. 12).

Таблица 13. Средние значения диаметров колоний штаммов после периода хранения (на 10 сутки).

№	Вид	Средний диаметр колонии, мм			
		К	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы					
PR58	<i>A. bisporus</i>	18,9±0,42	4,6±0,32	9,1±0,24	–
RA01	<i>M. alliaceus</i>	23,3±0,2	14,3±0,22	16,6±0,2	–
MR61	<i>S. globosum</i>	29,3±0,12	22,6±0,1	23,3±0,11	22,4±0,1
Ксилосапротрофы					
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	41,2±0,05	9,6±0,04	14,2±0,07	–
FE25	<i>A. nigricans</i>	38,8±0,04	20,3±0,05	33,3±0,08	27,4±0,1
MR55	<i>F. rossica</i>	49,6±0,02	46,7±0,04	46,8±0,05	47,9±0,03
MR40	<i>G. lucidum</i>	33,1±0,1	32,3±0,1	26,1±0,11	36,7±0,1
MR57	<i>H. coralloides</i>	42,6±0,5	38,5±0,5	37,5±0,45	–
FE53	<i>H. erinaceus</i>	37,8±0,13	29,6±0,11	20,7±0,15	16,1±0,13
RA09	<i>H. flagellum</i>	19,4±0,18	–	6,9±0,11	–
FE20	<i>L. edodes</i>	31,7±0,2	–	11,3±0,21	14,4±0,2
RA03	<i>L. pyriforme</i>	20,5±0,22	–	17,3±0,13	–

FE34	<i>M. vassiljevae</i>	49,9±0,33	45,6±0,35	48,4±0,24	44,7±0,22
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	48,3±0,25	38,2±0,21	46,7±0,15	46,4±0,12
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	41,1±0,18	32,2±0,14	14,2±0,1	–
MR1	<i>P. ostreatus</i>	50,2±0,14	49,1±0,12	49,2±0,1	49,3±0,17
Паразиты насекомых					
MR67	<i>C. militaris</i>	30,4±0,22	11,2±0,2	10,3±0,23	12,5±0,21

Прим. К — контроль, Г — 10 % раствор глицерина, Т — 10 % раствор трегалозы, ГТ — смесь 10 % растворов глицерина и трегалозы.

Использование 10 % раствора глицерина в качестве криопротекторного соединения наиболее положительно влияло на штаммы видов *Hericium coralloides*, *H. erinaceus*, *Pleurotus ostreatus*. В то же время, штаммы видов *Hericium flagellum*, *Lycoperdon pyriforme*, не смогли пережить хранение в варианте с использованием раствора глицерина, показав, тем не менее, хорошие результаты в варианте с раствором трегалозы. Возможно, это вызвано индивидуальными особенностями штаммов или видов, для которых высокие концентрации глицерина могут быть цитотоксичными.

Применение 10 % раствора трегалозы позволило сохранить большинство исследуемых штаммов. Для отдельных штаммов видов, таких как *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula-judae*, *A. nigricans*, *Mycetinis alliaceus*, *Sarcosoma globosum*, это был наиболее эффективный криопротектор. При этом, культуры штаммов *Hericium flagellum* и *Lycoperdon pyriforme* сохранили свою жизнеспособность только в варианте эксперимента с использованием раствора трегалозы.

Таблица 14. Средние значения ростового коэффициента (РК) исследуемых штаммов после периода хранения.

Штамм	Вид	Ростовой коэффициент			
		К	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы					
PR58	<i>A. bisporus</i>	7,56±0,3	0,46±0,07	3,64±0,12	–
RA01	<i>M. alliaceus</i>	13,98±0,6	2,86±0,1	6,64±0,22	–
MR61	<i>S. globosum</i>	8,79±0,56	4,52±0,12	6,99±0,14	13,44±0,23
Ксилосапротрофы					
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	37,08±1,07	3,84±0,15	8,52±0,27	–
FE25	<i>A. nigricans</i>	23,28±0,75	8,12±0,3	19,98±0,37	16,44±0,21
MR55	<i>F. rossica</i>	44,64±0,84	42,03±1,03	42,12±1,15	43,11±0,98
MR40	<i>G. lucidum</i>	19,86±0,43	19,38±0,43	5,22±0,21	14,68±0,54
MR57	<i>H. coralloides</i>	17,04±0,51	15,4±0,67	15±0,51	–
FE53	<i>H. erinaceus</i>	15,12±0,72	11,84±0,24	8,28±0,32	6,44±0,18
RA09	<i>H. flagellum</i>	7,76±0,2	–	1,38±0,09	–

FE20	<i>L. edodes</i>	19,02±0,43	–	4,52±0,2	8,64±0,41
RA03	<i>L. pyriforme</i>	4,1±0,16	–	3,46±0,14	–
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	29,94±0,71	27,36±0,99	29,04±1,13	26,82±1,24
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	43,37±2,73	34,38±1,17	42,03±1,28	41,76±1,56
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	36,99±2,1	28,98±1,03	12,78±0,94	–
MR1	<i>P. ostreatus</i>	75,3±3,2	44,19±1,08	59,04±1,41	59,16±1,64
Паразиты насекомых					
MR67	<i>C. militaris</i>	27,36±1,47	6,72±0,41	6,18±0,33	11,25±0,56

Прим. К — контроль, Г — 10 % раствор глицерина, Т — 10 % раствор трегалозы, ГТ — смесь 10 % растворов глицерина и трегалозы.

Использование смеси растворов глицерина и трегалозы показало интересные результаты. Для ряда штаммов видов, таких как *Cordyceps militaris*, *Flammulina rossica*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Mycoleptodonoides vassiljevae*, *Pleurotus citrinopileatus*, *P. nebrodensis*, использование смеси криопротекторов было наиболее эффективным способом сохранить значения ростовых характеристик близкими к контролю. Тем не менее, использование смеси глицерина и трегалозы может приводить к гибели культур, что было показано для штаммов видов *Auricularia auricula-judae*, *Lycoperdon pyriforme*.

Хранение по «перлитовому протоколу» не смог пережить штамм вида *Phallus impudicus*. Вместе с этим, штамм вида *Fistulina hepatica* не смог сохранить свою жизнеспособность ни в одном из вариантов криохранения, что может быть связано с его эколого-трофической принадлежностью к группе паразитов высших растений, для выживания которых требуются специфические соединения, без которых они не могут переживать стрессовые условия.

Лучшие результаты после 8 месяцев хранения согласно «перлитовому протоколу» по сохранению физиологических характеристик показали штаммы видов, включённых в группу ксилосапротрофов, в то время как паразиты древесных пород не смогли сохранить свою жизнеспособность. Для гумусовых и подстилочных сапротрофов оптимальным криопротекторным соединением был 10 % раствор трегалозы, в то время как для ксилосапротрофов наиболее подходящими были 10 % раствор глицерина и смесь растворов глицерина и трегалозы.

3.3.6 Криохранение. «Зерновой протокол»

Было отмечено, что штаммы видов *Agaricus bisporus*, *Hericium coralloides* и *Pleurotus nebrodensis*, демонстрируют увеличение диаметра колонии и значений ростового коэффициента на 10 сутки инкубации по сравнению с контрольными значениями (табл. 15, 16). Это может быть связано с тем, что используемые нами криопротекторные соединения и носитель — отварное зерно пшеницы — могут служить дополнительными источниками питания для мицелия штаммов. Также, это может быть реакцией на стресс после разморозки, когда мицелий после разморозки формирует больше поисковых гиф.

Таблица 15. Средние значения диаметров колоний штаммов после периода хранения (на 10 сутки).

№	Вид	Средний диаметр колонии, мм			
		К	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы					
PR58	<i>A. bisporus</i>	18,9±0,42	9±0,33	22,7±0,31	19,9±0,22
RA01	<i>M. alliaceus</i>	23,3±0,2	14,3±0,2	17,3±0,22	16,8±0,17
MR61	<i>S. globosum</i>	29,3±0,12	22,8±0,1	25,7±0,13	24,3±0,21
Ксилосапротрофы					
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	41,2±0,05	13,4±0,07	26,8±0,05	23,2±0,09
FE25	<i>A. nigricans</i>	38,8±0,04	24,7±0,1	28,2±0,11	26,9±0,1
MR55	<i>F. rossica</i>	49,6±0,02	28,7±0,05	25,7±0,09	28,8±0,11
MR40	<i>G. lucidum</i>	33,1±0,1	31,8±0,13	26,7±0,11	26,1±0,07
MR57	<i>H. coralloides</i>	42,6±0,5	36,4±0,43	44,4±0,32	37,3±0,4
FE53	<i>H. erinaceus</i>	37,8±0,13	20,4±0,1	32,9±0,12	30,1±0,15
FE20	<i>L. edodes</i>	31,7±0,2	8,7±0,21	19,7±0,17	15,3±0,14
RA03	<i>L. pyriforme</i>	20,5±0,22	13,3±0,2	15,4±0,24	18±0,21
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	49,9±0,33	35,6±0,25	34,5±0,3	34,1±0,33
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	48,3±0,25	38,6±0,21	35,6±0,28	45±0,35
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	41,1±0,18	42,8±0,14	40,1±0,1	41,3±0,15
MR1	<i>P. ostreatus</i>	50,2±0,14	49,5±0,12	49,4±0,11	49,5±0,12
Паразиты насекомых					
MR67	<i>C. militaris</i>	30,4±0,22	7,1±0,13	8,3±0,18	9,1±0,2

Прим. К — контроль, Г — 10 % раствор глицерина, Т — 10 % раствор трегалозы, ГТ — смесь 10 % растворов глицерина и трегалозы.

Таблица 16. Средние значения ростового коэффициента (РК) исследуемых штаммов после периода хранения.

Штамм	Вид	Ростовой коэффициент			
		К	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы					
PR58	<i>A. bisporus</i>	7,56±0,3	1,8±0,02	9,08±0,12	7,96±0,1
RA01	<i>M. alliaceus</i>	13,98±0,6	5,72±0,07	6,92±0,09	6,72±0,11
MR61	<i>S. globosum</i>	8,79±0,56	4,56±0,2	5,14±0,19	7,29±0,22
Ксилосапротрофы					
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	37,08±1,07	8,04±0,32	24,12±0,41	20,88±0,45
FE25	<i>A. nigricans</i>	23,28±0,75	14,82±0,21	16,92±0,29	16,14±0,37
MR55	<i>F. rossica</i>	44,64±0,84	17,22±0,3	15,42±0,29	25,92±0,41
MR40	<i>G. lucidum</i>	19,86±0,43	19,08±0,34	16,02±0,43	15,66±0,19
MR57	<i>H. coralloides</i>	17,04±0,51	14,56±0,14	17,76±0,25	14,92±0,17
FE53	<i>H. erinaceus</i>	15,12±0,72	8,16±0,1	13,16±0,12	12,04±0,13
FE20	<i>L. edodes</i>	19,02±0,43	3,48±0,03	11,82±0,08	9,18±0,08
RA03	<i>L. pyriforme</i>	4,1±0,16	2,66±0,04	3,08±0,05	3,6±0,04
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	29,94±0,71	21,36±0,41	20,7±0,43	20,46±0,54
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	43,37±2,73	23,16±0,5	32,04±0,36	40,5±0,31
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	36,99±2,1	38,52±0,21	24,06±0,22	24,78±0,24
MR1	<i>P. ostreatus</i>	75,3±3,2	59,4±1,7	59,28±1,3	74,25±1,9
Паразиты насекомых					
MR67	<i>C. militaris</i>	27,36±1,47	6,39±0,04	7,47±0,09	8,19±0,1

В сравнении с «перлитовым протоколом», хранение чистых культур по «зерновому протоколу» позволило сохранить жизнеспособность почти всех отобранных штаммов. Так, штамм вида *Lycoperdon pyriforme*, утративший жизнеспособность в процессе хранения по «перлитовому протоколу», кроме варианта с добавлением 10 % раствора трегалозы, показал способность переживать 8-месячное хранение при отрицательных температурах в виде зернового мицелия во всех вариантах опыта.

Подводя итог, «зерновой протокол» показал наиболее высокую эффективность по сравнению с другими протоколами криохранения, позволив сохранить, и, в отдельных случаях, ускорить рост колоний (табл. 17) (табл. 20, 21, Приложение 3). Большинство почвенных сапротрофов, помещённых на хранение по «зерновому протоколу», показали лучшие ростовые характеристики для варианта опыта с использованием 10 % раствора трегалозы. Вместе с этим, ксилосапротрофные виды показывали наибольшие значения ростовых

характеристик как в вариантах опыта с 10 % раствором трегалозы, так и со смесью криопротекторов.

После периода хранения вышеперечисленными методами для подавляющего большинства штаммов наблюдали замедление роста (Приложение 3). При этом, замедление роста для штаммов, находившихся на хранении под слоем дистиллированной воды, было более слабым. Самые низкие значения диаметров колоний отмечали для культур, помещённых на хранение по методу «агаровых блоков». Использование «перлитового» и «зернового» протоколов позволило сохранить в жизнеспособном состоянии большинство включённых в работу штаммов, в отдельных случаях ускорив их рост.

Таблица 17. Средние значения диаметров колоний штаммов до и после периода хранения (на 10 сутки).

№	Вид	Средний диаметр колоний, мм						
		К	СП	ДВ	СУБ	АБ	ПП	ЗП
Гумусовые сапротрофы								
PR58	<i>A. bisporus</i>	18,9± 0,42*	16,4± 0,38	15,8± 0,37	–	3,4± 0,16	9,1± 0,19	22,7± 0,49
RA01	<i>M. alliaceus</i>	23,3± 0,2	19,8± 0,25	23,1± 0,24	н/д	13,2± 0,2	16,6± 0,18	17,3± 0,2
RA02	<i>P. impudicus</i>	16,3± 0,12	16,2± 0,12	15,1± 0,15	н/д	–	–	–
MR61	<i>S. globosum</i>	29,3± 0,12	26,3± 0,12	27,5± 0,15	н/д	17,3± 0,12	23,3± 0,15	25,7± 0,15
Ксилосапротрофы								
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	41,2± 0,05	36,7± 0,04	40,5± 0,04	8,3± 0,02	9,4± 0,03	14± 0,02	26,7± 0,02
FE25	<i>A. nigricans</i>	38,8± 0,04	35,6± 0,1	28,7± 0,12	н/д	29,6± 0,1	33,3± 0,12	26,9± 0,12
MR55	<i>F. rossica</i>	49,6± 0,02	48,3± 0,02	49,8± 0,03	21,2± 0,04	39,9± 0,02	47,9± 0,03	28,8± 0,02
MR40	<i>G. lucidum</i>	33,1± 0,1	29,8± 0,13	32,6± 0,15	н/д	32± 0,16	36,7± 0,12	31,8± 0,12
MR57	<i>H. coralloides</i>	42,6± 0,5	41± 0,16	42,1± 0,18	н/д	26,1± 0,19	38,5± 0,16	38,8± 0,12
FE53	<i>H. erinaceus</i>	37,8± 0,13	35,8± 0,12	37,1± 0,2	н/д	21,6± 0,19	29,6± 0,21	32,9± 0,18
RA09	<i>H. flagellum</i>	19,4± 0,18	16,9± 0,1	17,2± 0,12	н/д	–	6,9± 0,08	–
FE20	<i>L. edodes</i>	31,7± 0,2	31,3± 0,2	31,6± 0,19	н/д	22,8± 0,25	14,4± 0,18	19,7± 0,11
RA03	<i>L. pyriforme</i>	20,5± 0,22	19,8±0 ,12	16,6± 0,18	н/д	16,3± 0,12	17,3± 0,2	18± 0,15
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	49,9±	48,4±	49,6±	н/д	43,9±	48,4±	35,6±

		0,33	0,19	0,4		0,33	0,19	0,18
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	48,3± 0,25	48± 0,15	47,4± 0,19	н/д	42,2± 0,29	46,7± 0,37	45± 0,35
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	41,1± 0,18	36,4± 0,2	37,66± 0,14	н/д	46,4± 0,18	43,3± 0,2	42,8± 0,22
MR1	<i>P. ostreatus</i>	50,2± 0,14	47,7± 0,18	50,1± 0,1	20,7± 0,07	48,9± 0,12	49,3± 0,1	49,5± 0,18
Паразиты древесных растений								
RA04	<i>F. hepatica</i>	6,7± 0,1	6,5± 0,1	6,4± 0,1	н/д	—	—	—
FE30	<i>S. latifolia</i>	4,3± 0,05	4,2± 0,07	4,2± 0,05	н/д	—	—	—
Паразиты насекомых								
MR67	<i>C. militaris</i>	30,4± 0,22	19,5± 0,2	29,5± 0,18	н/д	—	12,5± 0,14	9,1± 0,12

Примечание: К — контроль, СП — серийные пересевы, ДВ — дистиллированная вода, СУБ — сублимационная сушка, АБ — агаровые блоки, ПП — «перлитовый протокол», ЗП — «зерновой протокол».

Для изученных 20 штаммов макромицетов оптимальными были метод хранения под слоем дистиллированной воды, а также «перлитовый» и «зерновой» протоколы криохранения. Оптимальными криопротекторами были 10 % раствор трегалозы и смесь 10 % растворов глицерина и трегалозы, субстрат-носителями — измельчённый перлит и зерно пшеницы. Целесообразным представляется проведение индивидуального подбора методов хранения, криопротекторов, их концентраций и комбинаций для разных видов, а возможно, и для отдельных штаммов. Помимо этого, необходимым является расширение спектра изучаемых видов. Зависимости между таксономической принадлежностью и наиболее подходящими протоколами хранения, криопротекторами или субстрат-носителями не обнаружено.

3.4 Эндоглюканазная активность штаммов

Вместе с морфолого-культуральными и физиологическими характеристиками, биохимические характеристики являются одним из основных параметров оценки физиологии штаммов макромицетов. Для изучения были выбраны эндоглюканазы, входящие в состав целлюлозолитического комплекса, поскольку они играют важную роль в процессе разрушения целлюлозы — одного из основных питательных субстратов для макромицетов.

3.4.1 Хранение на агаризованных средах

Для культур макромицетов, помещённых на хранение методом серийных пересевов, активность эндоглюканаз была самой низкой, что может быть связано с использованием неоптимальных сред, старением культуры и, возможно, долгим отсутствием роста на целлюлозных субстратах (табл. 18). Активность эндоглюканаз для культур, находившихся под слоем дистиллированной воды, была выше. Подобное может быть вызвано тем, что культуры, помещённые на хранение после 2–3 пассажей с момента выделения из спорокарпов, находились в микроаэробных условиях, при низких температурах, что позволило снизить физиологическую активность, тем самым, избежать старения.

Таблица 18. Эндоглюканазная активность штаммов макромицетов после периода хранения.

№	Вид	Средняя эндоглюканазная активность, ед.										
		СП	ДВ	«Агаровые блоки»			«Перлитовый протокол»			«Зерновой протокол»		
				Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы												
PR58	<i>A. bisporus</i>	0,103 ± 0,003	0,117 ± 0,002	0,098 ± 0,004	0,104 ± 0,003	0,102 ± 0,002	0,110 ± 0,002	0,128 ± 0,004	—*	0,210 ± 0,006	0,287 ± 0,009	0,223 ± 0,007
RA03	<i>L. pyriforme</i>	0,121 ± 0,003	0,146 ± 0,003	0,122 ± 0,004	0,132 ± 0,003	0,15± 0,004	—	0,145 ± 0,005	—	0,161 ± 0,005	0,193 ± 0,006	0,2± 0,007
RA01	<i>M. alliaceus</i>	0,198 ± 0,004	0,235 ± 0,005	0,11± 0,002	0,135 ± 0,002	0,124 ± 0,002	0,178 ± 0,003	0,222 ± 0,004	—	0,23± 0,005	0,3± 0,008	0,287 ± 0,008
RA02	<i>P. impudicus</i>	0,109 ± 0,002	0,111 ± 0,002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MR61	<i>S. globosum</i>	0,392 ± 0,013	0,454 ± 0,013	0,413 ± 0,012	0,421 ± 0,014	0,427 ± 0,013	0,388 ± 0,014	0,482 ± 0,015	0,422 ± 0,013	0,763 ± 0,017	0,93± 0,02	0,87± 0,019
Ксилосапротрофы												
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	0,51± 0,012	0,545 ± 0,013	—	0,423 ± 0,01	—	0,402 ± 0,014	0,434 ± 0,012	—	0,523 ± 0,015	0,63± 0,017	0,588 ± 0,014
FE25	<i>A. nigricans</i>	0,18± 0,002	0,285 ± 0,005	0,09± 0,002	0,11± 0,003	0,105 ± 0,003	0,243 ± 0,005	0,27± 0,007	0,277 ± 0,007	0,286 ± 0,008	0,29± 0,01	0,297 ± 0,011
MR55	<i>F. rossica</i>	0,271 ± 0,003	0,289 ± 0,003	0,231 ± 0,004	0,243 ± 0,004	0,293 ± 0,005	0,277 ± 0,005	0,281 ± 0,004	0,303 ± 0,003	0,263 ± 0,004	0,26± 0,003	0,267 ± 0,002
MR40	<i>G. lucidum</i>	0,621 ± 0,016	0,667 ± 0,015	0,634 ± 0,018	0,645 ± 0,016	0,697 ± 0,015	0,672 ± 0,014	0,71 ± 0,015	0,779 ± 0,016	0,672 ± 0,014	0,623 ± 0,015	0,987 ± 0,027
MR57	<i>H. coralloides</i>	0,542 ± 0,014	0,592 ± 0,013	0,278 ± 0,007	0,234 ± 0,006	0,298 ± 0,008	0,54± 0,017	0,566 ± 0,016	—	0,562 ± 0,015	0,57 ± 0,014	0,615 ± 0,013
FE53	<i>H. erinaceus</i>	0,343 ± 0,007	0,402 ± 0,008	0,245 ± 0,007	0,378 ± 0,008	0,37± 0,006	0,38± 0,006	0,396 ± 0,007	0,41± 0,007	0,474 ± 0,009	0,94± 0,033	0,782 ± 0,023
RA09	<i>H. flagellum</i>	0,712 ±	0,783 ±	—	—	—	—	0,696 ±	—	—	—	—

		0,017	0,017					0,02				
FE20	<i>L. edodes</i>	0,683 ± 0,014	0,722 ± 0,018	0,432 ± 0,01	0,501 ± 0,01	0,479 ± 0,012	–	0,623 ± 0,013	0,515 ± 0,013	0,711 ± 0,022	0,94± 0,027	0,745 ± 0,021
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	0,914 ± 0,027	0,992 ± 0,028	0,756 ± 0,018	0,777 ± 0,02	0,81± 0,021	0,793 ± 0,02	0,832 ± 0,019	0,817 ± 0,019	1,043 ± 0,028	1,1± 0,029	1,132 ± 0,027
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	0,571 ± 0,011	0,68± 0,014	0,221 ± 0,004	0,24± 0,004	0,249 ± 0,004	0,331 ± 0,005	0,346 ± 0,005	0,39± 0,006	0,704 ± 0,019	0,78± 0,018	0,86± 0,02
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	0,488 ± 0,009	0,498 ± 0,008	0,233 ± 0,003	0,217 ± 0,002	0,246 ± 0,002	0,418 ± 0,011	0,442 ± 0,01	0,469 ± 0,012	0,513 ± 0,013	0,56± 0,015	0,572 ± 0,015
MR1	<i>P. ostreatus</i>	0,684 ± 0,015	0,773 ± 0,014	0,582 ± 0,013	0,594 ± 0,014	0,615 ± 0,014	0,603 ± 0,014	0,602 ± 0,015	0,619 ± 0,015	0,799 ± 0,021	0,82± 0,026	0,844 ± 0,025
Паразиты древесных растений												
RA04	<i>F. hepatica</i>	0,09± 0,001	0,11± 0,002	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FE30	<i>S. latifolia</i>	0,1± 0,001	0,12± 0,001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Паразиты насекомых												
MR67	<i>C. militaris</i>	0,081 ± 0,002	0,099 ± 0,001	0,071 ± 0,001	0,082 ± 0,001	0,101 ± 0,002	0,098 ± 0,001	0,095 ± 0,001	0,110 ± 0,002	0,177 ± 0,002	0,18± 0,002	0,167 ± 0,002

3.4.2 Криохранение.

Эндоглюканазная активность культур, помещённых на криохранение по методу «агаровых блоков», также была на низком уровне. Подобное можно объяснить использованием неоптимального протокола криохранения. Более высокие значения были получены для культур, хранившихся по «перлитовому» и, особенно, «зерновому» протоколу.

Высокую активность эндоглюканаз у культур, хранившихся по «перлитовому» и «зерновому» протоколам, можно объяснить тем, что, как было показано ранее, культуры лучше сохраняют свои ростовые характеристики. Использование перлита позволяет сохранять целлюлозолитическую активность на достаточно высоком уровне, что может быть связано с тем, что перлит, обладающий пористой структурой, способен сглаживать выброс скрытой тепловой энергии в момент заморозки биоматериала, что, в свою очередь, может влиять на физиолого-биохимические характеристики мицелия (Tan et al., 2021). Зерно пшеницы богато не только крахмалом и другими сахарами, но и целлюлозой, которые, после термической обработки становятся более доступными для мицелия в процессе его роста. Таким образом, на момент заморозки, мицелий активно разлагает не только более доступные соединения, но

и целлюлозу, что позволяет сохранить активность целлюлозолитического комплекса. Использование «зернового протокола» в комбинации с 10 % раствором трегалозы позволяет добиться сравнительно высоких значений эндоглюканазной активности уже на стадии хранения, что может быть очень полезным в работе с промышленными штаммами макромицетов, поскольку позволяет ускорить процесс колонизации целлюлозосодержащих субстратов.

По результатам исследования, изученные штаммы можно разделить на две группы по зависимости эндоглюканазной активности от методов хранения культур: слабо зависимые и сильно зависимые. К первым относят штаммы, для которых не регистрировали сильных изменений активности эндоглюканаз в зависимости от используемого метода хранения. Это были штаммы видов *Agaricus bisporus* (PR58), *Auricularia auricula-judae* (MR16), *A. nigricans* (FE25), *Cordyceps militaris* (ME67), *Flammulina rossica* (MR55), *Ganoderma lucidum* (MR40), *Lycoperdon pyriforme* (RA03), *Mycetinis alliaceus* (RA01), *Mycoleptodonoides vassiljevae* (FE34), *Pleurotus nebrodensis* (PR62), *Pleurotus ostreatus* (MR1). Ко второй группе относили штаммы *Hericium coralloides* (MR57), *H. erinaceus* (FE53), *Lentinula edodes* (FE20), *Pleurotus citrinopileatus* (FE27), *Sarcosoma globosum* (MR61). Подобные различия можно объяснить индивидуальными особенностями штаммов и, возможно, видовой специфичностью. В то же время, зависимости между таксономической принадлежностью и эндоглюканазной отмечено не было.

Было отмечено, что штаммы, относящиеся к различным эколого-трофическим группам, обладают различающимися границами эндоглюканазной активности. Так, штаммы *Agaricus bisporus* (PR58), *Lycoperdon pyriforme* (RA03), *Mycetinis alliaceus* (RA01), *Phallus impudicus* (RA02), виды которых включены в группу гумусовых сапротрофов, показали сравнительно низкую активность эндоглюканаз, в пределах значений от 0,098 до 0,297 единиц. Как и в случае с физиологическими характеристиками, наиболее высокие значения активности регистрировали для культур, хранившихся под слоем дистиллированной воды и по «зерновому протоколу» криохранения в вариантах с использованием 10 %

раствора трегалозы и смеси КПС. Штамм *Sarcosoma globosum*, также гумусовый сапротроф, напротив, демонстрировал сравнительно более высокие значения активности эндоглюканаз — от 0,392 до 0,93 единиц. Исходя из не до конца изученных эколого-трофических характеристик *Sarcosoma globosum*, можно предположить, что сравнительно более высокая активность эндоглюканаз связана с тем, что мицелий данного вида может активно разлагать как гумус, так и лесную подстилку. Низкие значения эндоглюканазной активности, показанные для упомянутых выше штаммов, можно объяснить как их особенностями питания, так и тем, что, возможно, бóльшую роль в разложении целлюлозы играют экзоглюканазы и глюкозидазы, так же входящие в состав целлюлозолитического комплекса (Синицын и др., 1995).

Ксилосапротрофные виды продемонстрировали высокую активность эндоглюканаз в более широких границах — от 0,09 до 1,132 единиц. Культуры штаммов *Fistulina hepatica* (RA04) и *Sparassis latifolia* (FE30), относящихся к группе паразитов высших растений, продемонстрировали низкие значения активности эндоглюканаз (0,09–0,11 и 0,1–0,12, соответственно). Схожие значения (от 0,071 до 0,18 единиц) были показаны для паразита насекомых *Cordyceps militaris* (MR67). Подобные отличия можно объяснить особенностями питания отобранных штаммов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из использованных в работе методов хранения только метод серийных пересевов и хранения под слоем дистиллированной воды позволили сохранить жизнеспособность всех штаммов рабочей коллекции. Из протоколов криохранения оптимальными были «перлитовый протокол» и «зерновой протокол». Метод «агаровых блоков» показал худшие результаты. Хранение штаммов в сублимированном состоянии показало, что, при соблюдении определённых условий и подборе правильного протокола и способа регидратации, макромицеты могут сохранять свою жизнеспособность после лиофилизации.

Все протоколы хранения оказывали влияние на морфолого-культуральные характеристики штаммов макромицетов. Для исследуемых штаммов было зарегистрировано пять типов колоний. Были единичные случаи изменения типа колонии после периода хранения, для которых отмечали более слабую выраженность концентричности мицелия. Тип края колонии и окраска аверса и реверса оставались неизменными. Фиксировали слабое развитие воздушного мицелия, снижение плотности колоний, уменьшение числа пряжек на длину гифы или их полную утрату. Было отмечено формирование хламидоспор, обладающих значительной устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды. Бóльшее влияние на морфолого-культуральные характеристики было показано для культур, помещённых на хранение методом серийных пересевов и по протоколу криохранения с использованием «агаровых блоков».

Было зафиксировано влияние методов хранения на физиологические характеристики штаммов. Так, для подавляющего большинства штаммов наблюдали замедление роста. Замедление роста колоний было наиболее значительным для культур, хранившихся на «агаровых блоках». Использование «перлитового» и «зернового» протоколов позволило сохранить в жизнеспособном состоянии большинство включённых в работу штаммов, в отдельных случаях ускорив их рост и увеличив значения ростового коэффициента.

Регистрировали влияние методов хранения на эндоглюканазную активность исследуемых штаммов макромицетов. Для большинства штаммов

наиболее высокие значения эндогликаназной активности регистрировали у культур, помещённых на хранение под слой дистиллированной воды и «зернового протокола» криохранения в варианте с использованием 10 % раствора трегалозы. Было отмечено, что ксилосапротрофные штаммы демонстрировали более высокие значения эндогликаназной активности, что связано с их особенностями питания.

Общепринятые протоколы хранения культур макромицетов показали свою высокую видоспецифичность. Целесообразным представляется проведение индивидуального подбора методов хранения, криопротекторов, их концентраций и комбинаций для разных видов, а возможно, и для отдельных штаммов. Помимо этого, необходимым является расширение спектра изучаемых видов. Зависимости между таксономической принадлежностью и наиболее подходящими протоколами хранения, криопротекторами или субстрат-носителями не обнаружено.

К направлениям дальнейшей работы относим подробное изучение влияния концентрации криопротекторных соединений, скорости замораживания, используемых субстрат-носителей на жизнеспособность, морфолого-культуральные, физиологические и биохимические характеристики, расширение исследования целлюлазной активности штаммов и проведение опытов по изучению влияния хранения на способность к формированию плодовых тел в лабораторных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что для хранения активно растущего мицелия макромицетов наиболее эффективно использовать следующие протоколы хранения: под слоем дистиллированной воды, «перлитовый» и «зерновой» протоколы криохранения.
2. Хранение штаммов макромицетов общепринятыми и модифицированными протоколами оказывает влияние на морфолого-культуральные и физиологические характеристики культур, приводя к снижению плотности мицелия, уменьшению числа пряжек, замедлению роста колоний.
3. Оптимальными криопротекторами для криохранения штаммов гумусовых сапротрофов и ксилосапротрофов являются трегалоза и смесь трегалозы и глицерина (1:1).
4. Отмечено, что использование измельчённого перлита и зерна пшеницы в качестве носителя позволяет добиться лучшего сохранения морфолого-культуральных и физиологических характеристик мицелия.
5. Показано, что использование «зернового протокола» хранения штаммов позволяет сохранять на высоком уровне эндоглюканазную активность. Эндоглюканазная активность ксилосапротрофных макромицетов выше, чем у представителей других эколого-трофических групп.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность моим научным руководителям и наставникам, д.б.н. проф. Гарибовой Лидии Васильевне и д.б.н. проф. Сидоровой Ирине Ивановне за их чуткое руководство, доверие и ценнейшие указания по выполнению данной работы, ведущему инженеру кафедры микологии и альгологии Дьякову Максиму Юрьевичу за помощь в организации экспериментальной части работы, ценные комментарии и моральную поддержку, д.б.н. в.н.с. кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Александровой АLINE Витальевне за ценные замечания и комментарии по оформлению результатов работы и публикаций, Борису Александровичу Борисову (ООО «Агробιοтехнология») за штамм *Cordyceps militaris*, коллективу «Школы Грибоводства» и Михаилу Прохорову за предоставление штамма *Agaricus bisporus* и плодовых тел *Pleurotus nebrodensis*, коллективу НОШ «Космос» космического факультета МГУ за предоставление необходимого оборудования, а также всем членам моей семьи и близким за их неоценимую поддержку и терпение. Работа выполнена с использованием оборудования, приобретённого за счёт средств Программы развития Московского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антропова А.Б., Белозерская Т.А., Белозерский М.А., Бибикова М.В., Биланенко Е.Н., Воронко О.В., Георгиева М.Л., Гесслер Н.Н., Грум-Гржимайло А.А., Грум-Гржимайло О.А., Гусаков А.В., Дерябина Ю.И., Дунаевский Я.Е., Камзолкина О.В., Козлова М.В., Кудрявцева О.А., Кураков А.В., Мажейка И.С., Шпичка А.И., Садыкова В.С., Семенова Е.Ф., Филиппович С.Ю. Практикум по физиологии и биохимии грибов. Учебное пособие (ред. А.В. Кураков). М.: Изд. Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 2017. 215 с.
2. Белова Н.В., Псурцева Н.В., Гачкова Е.Ю., Озерская С.М. Сохранение разнообразия базидиомицетов *ex situ* в специализированной коллекции культур ЛЕ (БИН). Микология и фитопатология. 2005. Т. 39, № 2. С. 1–10.
3. Бондарцев А.С. Трутовые грибы Европейской части СССР и Кавказа. М., Ленинград, 1953. 1106 с.
4. Бондарцев А.С., Зингер Р.А. Руководство по сбору высших базидиальных грибов для научного их изучения. Труды Ботанического института им. В.Л. Комарова Академии Наук СССР. Т. 11, № 6. Ленинград: Издательство Академии наук СССР, 1950. 45 с.
5. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: «Наукова думка», 1988. 143 с.
6. Великанов Л.Л., Сидорова И.И., Успенская Г.Д. Полевая практика по экологии грибов и лишайников. М.: Издательство Московского университета, 1980. 112 с.
7. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А., Коваль Э.З., Горбик Л.Т., Никольская Е.А., Билай В.И., Билай Т.И., Борисова В.Н., Сиверс В.С., Мусич Е.Г., Лизак Ю.В., Стрижевская А.Я., Айзенберг В.Л., Кириллова Л.М., Безбородова С.И., Зайченко А.М., Закордонец Л.А., Метейко Т.Я., Черменский Д.Н., Щербина С.М., Харченко С.Н., Курбацкая З.А., Безбородов А.М., Богомолова Л.А., Берестецкий О.А., Патыка В.Ф., Левитин М.М., Михайлова Л.А., Одинцова И.Г., Афанасенко О.С., Жданова Н.Н., Василевская А.И., Кашкин П.Н., Кириленко Т.С., Бухало А.С., Редчиц Т.И. Методы экспериментальной

- микологии. Справочник (отв. ред. В. И. Билай). Киев: «Наукова думка», 1982. 550 с.
8. *Змитрович И.В., Столярская М.В., Калиновская Н.И., Попов Е.С., Мясников А.Г., Морозова О.В., Волобуев С.В., Большаков С.Ю., Светашева Т.Ю., Бондарцева М.А., Коваленко А.Е.* Макромицеты Нижне-Свирского заповедника (аннотированный список видов) (ред. Столярская М.В.). СПб: ООО «Свое издательство», 2015. 185 с. + 16 с. цв. вкл.
 9. *Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Еремина С.С., Озерская С.М.* Опыт использования современных методов длительного хранения грибов во Всероссийской коллекции микроорганизмов // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44, № 1. С. 19–30.
 10. *Камзолкина О.В., Богданов А.Г.* Методическое пособие по микроскопии в исследованиях грибов и водорослей. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2017. 115 с.
 11. *Коваленко А.Е.* Экологический обзор грибов из порядков Polyporales s. str., Boletales, Agaricales s. str., Russulales в горных лесах центральной части Северо-Западного Кавказа // Микология и фитопатология. 1980. Т. 14, № 4. С. 300–314.
 12. *Красильников Н.А.* Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. М.: «Наука», 1967. 150 с.
 13. *Кривушина А.А., Бобырева Т.В., Яковенко Т.В., Николаев Е.В.* Методы хранения микроорганизмов-деструкторов в коллекции ФГУП "ВИАМ" (обзор). Авиационные материалы и технологии. 2019. №. 3 (56). С. 89–94.
 14. *Литвинов М.А.* Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Ленинград: «Наука», 1969. 121 с.
 15. *Озерская С.М.* Грибы в коллекциях культур: фундаментальные и прикладные аспекты. Диссертация доктора биологических наук. Москва, 2012. 425 с.
 16. *Охапкина В.Ю.* Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация. Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 4. С. 21–32.

17. *Оханкина В.Ю., Шабалин Б.А.* Методы поддержания микробных культур. Часть 1. Криоконсервация. Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 1. С. 18–27.
18. *Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В.* Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009. №. 4. С. 99–121.
19. *Псурцева Н.В., Кияшко А.А., Сеник С.В.* Базидиальные грибы Ботанического сада Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН в чистой культуре // Ботаника: история, теория, практика (к 300-летию основания Ботанического института им. В. Л. Комарова Российской академии наук): Труды международной научной конференции. 2014. 260 с.
20. *Псурцева Н.В., Кияшко А.А.* Научно-практический потенциал генофонда грибов в коллекции культур базидиомицетов БИН РАН // Коллекции как основа изучения генетических ресурсов растений и грибов: Тезисы докладов Всероссийской конференции. Санкт-Петербург, 22–23 июня 2022 г. (в рамках Первого научного форума «Генетические ресурсы России», 21–24 июня 2022 г.). – СПб.: Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 2022. 64 с.
21. *Столярская М.В., Коваленко А.Е.* Грибы Нижнесвирского заповедника. Вып. 1. Макромицеты (преимущественно агарикоидные базидиомицеты): Аннотированные списки видов. СПб: Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 1996. 59 с.
22. *Терешина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р.* Влияние различных тепловых воздействий на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля у мицелиальных грибов // Микробиология. 2011. Т. 80, № 4. С. 447–453.
23. *Турковская О.В., Позднякова Н.Н.* Особенности использования грибов в экологических биотехнологиях // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. Т. 3, № 5. С. 60–66.
24. *Утепешева А.А.* Подбор методов длительного хранения коллекционных штаммов микромицетов и дрожжей. Экобиотех. 2019. Т. 2., №. 4. Р. 494–498.

25. Abrego N., Oivanen P., Viner I., Norden J., Penttilä R., Dahlberg A., Heilmann-Clausen J., Somervuo P., Ovaskainen O., Schigel D. Reintroduction of threatened fungal species via inoculation. *Biological Conservation*. 2016. V. 203. P. 120–124.
26. Ahlawat O.P., Manikandan K., Singh M. Proximate composition of different mushroom varieties and effect of UV light exposure on vitamin D content in *Agaricus bisporus* and *Volvariella volvacea*. *Mushroom Research*. 2016. V. 25 (1). P. 1–8.
27. Albu C.V., Rădoi T.A., Diguță C.F., Matei F., Cornea C.P. Screening among micro and macromycetes for laccase production. *AgroLife Scientific Journal*. 2020. V. 9 (1). P. 11–16.
28. Alexiades V., Solomon A.D. Critical radius for nucleation. Oak Ridge National Lab. 1986. <https://doi.org/10.2172/5762299>.
29. Arai T., Fukami D., Hoshino T., Kondo H., Tsuda S. Ice-binding proteins from the fungus *Antarctomyces psychrotrophicus* possibly originate from two different bacteria through horizontal gene transfer. *The FEBS journal*. 2019. V. 286 (5). P. 946–962. <https://doi.org/10.1111/febs.14725>.
30. Atila F. Evaluation of suitability of various agro-wastes for productivity of *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus eryngii* mushrooms. *Journal of Experimental Agriculture International*. 2017. V. 17 (5). P. 1–11. <http://doi.org/10.9734/JEAI/2017/36346>.
31. Atila F. Comparative evaluation of the antioxidant potential of *Hericium erinaceus*, *Hericium americanum* and *Hericium coralloides*. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. 2019. V. 18 (6). P. 97–106. <https://doi.org/10.24326/asphc.2019.6.10>.
32. Atila F., Owaid M.N., Shariati M.A. The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: a review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2017. V. 7 (3). C. 281–286. <http://doi.org/10.15414/jmbfs.2017/18.7.3.281-286>.

33. *Balaeş T., Mangalagiu I.I., Tănase C.* Lignicolous macromycetes: Potential Candidates for Bioremediation of Synthetic Dyes. *Revista de Chimie*. 2013. V. 64 (9). P. 790–795. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0302-5>.
34. *Balaeş T., Tănase C., Butnariu C.* The use of heavy metals in mycoremediation of synthetic dyes. *Open Life Sciences*. 2014. V. 9 (7). P. 659–667. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0302-5>.
35. *Baldrian P.* Enzymes of saprotrophic basidiomycetes. British mycological society symposia series. Academic Press, 2008a. V. 28. P. 19–41.
36. *Baldrian P.* Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology*. 2008b. V. 1 (1). P. 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.02.001>.
37. *Baldrian P., Valášková V.* Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS microbiology reviews*. 2008. V. 32 (3). P. 501–521.
38. *Benedek T.* Fragmenta mycologica. II. On Castellani's "water cultures" and Benedek's "mycotheca" in chlorallactophenol. *Mycopathologia*. 1962. V. 17 (3). P. 255–260. <https://doi.org/10.1007/BF02279298>.
39. *Bertéli M.B.D., Pinheiro C.R., Philadelpho B.O., Otero D.M., Ribeiro C.D.F., de Souza C.O., Ferreira E.S., Ruiz S.P., do Valle J.S., Linde G.A., Colauto N.B.* Long-term cryopreservation of *Lentinus crinitus* strains by wheat grain technique. *Journal of Microbiological Methods*. 2022. V. 198. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106491>.
40. *Best B.P.* Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*. 2015. V. 18 (5). P. 422–436. <http://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>.
41. *Bisko N.A., Sukhomlyn M.M., Mykchaylova O.B., Lomberg M.L., Tsvyd N.V., Petrichuk Y.V., Al-Maali G., Mytropolska N.Y.* Ex situ conservation of rare and endangered species in mushroom culture collections of Ukraine. *Ukrainskiy botanichniy zhurnal*. 2018. V. 75 (4). P. 338–347. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj75.04.338>.
42. *Borg-Karlson A.K., Englund F.O., Unelius C.R.* Dimethyl oligosulphides, major volatiles released from *Sauromatum guttatum* and *Phallus impudicus*.

- Phytochemistry. 1994. V. 35 (2). P. 321–323. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94756-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94756-3).
43. *Borman A.M., Szekely A., Campbell C.K., Johnson E.M.* Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*. 2006. V. 161 (6). P. 361–368. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0023-z>.
44. *Brayton C.F.* Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell Veterinarian*. 1986. V. 76 (1). P. 61–90.
45. *Buell C.B., Weston W.H.* Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. *American Journal of Botany*. 1947. V. 34 (10). P. 555–561. <https://doi.org/10.2307/2437337>.
46. *Burdsall H.H. Jr., Dorworth E.B.* Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia*. 1994. V. 86 (2). P. 275–280. <https://doi.org/10.1080/00275514.1994.12026408>.
47. *Calcott P.H., MacLeod R.A.* Survival of *Escherichia coli* from freeze–thaw damage: a theoretical and practical study. *Canadian Journal of Microbiology*. 1974. V. 20 (5). P. 671–681. <https://doi.org/10.1139/m74-103>.
48. *Castellani A.* Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathologia*. 1963. V. 20. (1). P. 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF02054872>.
49. *Castro-Rios K., Bermeo-Escobar L.P.* Methods for the culture conservation of edible and medicinal fungi. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2021. V. 10 (4). P. 620–625. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2021.10.4.620-625>.
50. *Challen M.P., Elliot T.J.* Polypropylene straw ampoules for the storage of microorganisms in liquid nitrogen. *Journal of Microbiological Methods*. 1986. V. 5 (1). P. 11–22. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(86\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0167-7012(86)90019-9).
51. *Chang S.T.* World Production of Cultivated Edible and Medicinal Mushrooms in 1997 with Emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, in China. *International*

- Journal of Medicinal Mushrooms. 1999. V. 1 (4). P. 291–300. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v1.i4.10>.
52. Chapman J.D., Doern S.D., Reuvers A.P., Gillespie C.J., Chatterjee A., Blakely E.A., Smith K.C., Tobias C.A. Radioprotection by DMSO of Mammalian Cells Exposed to X-Rays and to Heavy Charged-Particle Beams. *Radiation and Environmental Biophysics*. 1979. V. 16 (1). P. 29–41. <https://doi.org/10.1007/BF01326894>.
 53. Chavarri F.J., De Paz M., Nuñez M. Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains. *Biotechnology Letters*. 1988. V. 10 (1). P. 11–16. <https://doi.org/10.1007/BF01030016>.
 54. Chaytor J.L., Tokarew J.M., Wu L.K., Leclère M., Tam R.Y., Capicciotti C.J., Guolla L., von Moos E., Findlay C.S., Allan D.S., Ben R.N. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*. 2012. V. 22 (1). P. 123–133. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr115>.
 55. Chen T.H.H., Kartha K.K., Constabel F., Gusta L.V. Freezing Characteristics of Cultured *Catharanthus roseus* (L). G. Don Cells Treated with Dimethylsulfoxide and Sorbitol in Relation to Cryopreservation. *Plant Physiology*. 1984. V. 75 (3). P. 720–725. <https://doi.org/10.1104/pp.75.3.720>.
 56. Chen Y., Xue Y. Purification, chemical characterization and antioxidant activities of a novel polysaccharide from *Auricularia nigricans*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. V. 120. P. 1087–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.160>.
 57. Colauto N.B., da Eira A.F., Linde G.A. Cryopreservation at –80°C of *Agaricus blazei* on rice grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011. V. 27 (12). P. 3015–3018. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0772-9>.
 58. Colauto N.B., da Eira A.F., Linde G.A. Cryopreservation of *Agaricus blazei* in liquid nitrogen using DMSO as cryoprotectant. *Bioscience Journal*. 2012a. V. 28 (6). P. 1034–1037.
 59. Colauto N.B., Cordeiro F.A., Geromini K.V.N., de Lima T.G., Lopes A.D., Nunes R.A.R., Roratto F. de Brito, Tanaka H.S., Zaghi L.L. Jr., Linde G.A. Viability of

- Agaricus blazei* after long-term cryopreservation. *Annals of Microbiology*. 2012b. V. 62 (2). P. 871–876. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0368-5>.
60. Crahay C., Declerck S., Colpaert J.V., Pigeon M., Munaut F. Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. *Fungal Biology*. 2013. V. 117 (2). P. 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.12.003>.
 61. Croan S.C., Burdsall H.H. Jr., Rentmeester R.M. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes. *Mycologia*. 1999. V. 91 (5). P. 908–916. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061098>.
 62. Croan S.C. Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting Basidiomycotina. *Mycologia*. 2000. V. 92 (4). P. 810–817. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061223>.
 63. Danell E., Flygh G. Cryopreservation of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycological Research*. 2002. V. 106 (11). P. 1340–1342. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006706>.
 64. de Capriles C.H., Mata S., Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*. 1989. V. 106. P. 73–79. <https://doi.org/10.1007/BF00437084>.
 65. Declerck S., Angelo-Van Coppenolle M.G. Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*. 2000. V. 148 (1). P. 169–176. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00740.x>.
 66. Deepalakshmi K., Sankaran M. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology*. 2014. V. 5 (2). P. 718–726.
 67. Deshmukh R., Khardenavis A.A., Purohit H.J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*. 2016. V. 56 (3). P. 247–264. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>.
 68. Dowding E.S., Bulmer G.S. Notes on the cytology and sexuality of puffballs. *Canadian Journal of Microbiology*. 1964. V. 10 (5). P. 783–789. <https://doi.org/10.1139/m64-099>.

69. *Duan G.L., Yu X.* Isolation, purification, characterization, and antioxidant activity of low-molecular-weight polysaccharides from *Sparassis latifolia*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. V. 137. P. 1112–1120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.177>.
70. *Duncan E.G., Keay S.M.* Aberrant dikaryons in the Lycoperdaceae. *Mycologia*. 1990. V. 82 (1). P. 17–22. <https://doi.org/10.2307/3759958>.
71. *Eggen T., Majcherczyk A.* Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1998. V. 41 (2). P. 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00002-X).
72. *Elliott T.J.* Alternative ampoule for storing fungal cultures in liquid nitrogen. *Transactions of the British Mycological Society*. 1976. V. 67(3). P. 545–546. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(76\)80197-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(76)80197-0).
73. *Ellis J.J.* Preserving Fungus Strains in Sterile Water. *Mycologia*. 1979. Vol. 71 (5). P. 1072–1075. <https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021113>.
74. *Fang Y., Xiao B., Tao J., Sun J., Perdew J.P.* Ice phases under ambient and high pressure: Insights from density functional theory. *Physical Review B*. 2013. V. 87 (21). P. 1–6. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.87.214101>.
75. *Farrant J.* Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1977. V. 278 (959). P. 191–205. <https://doi.org/10.1098/rstb.1977.0037>.
76. *Fennell D.I.* Conservation of fungous cultures. *Botanical Review*. 1960. V. 26 (1). P. 79–141. <https://doi.org/10.1007/BF02860481>.
77. *Feofilova E.P., Usov A.I., Mysyakina I.S., Kochkina G.A.* Trehalose: Chemical Structure, Biological Functions, and Practical Application. *Microbiology*. 2014. V. 83 (3). P. 184–194. <https://doi.org/10.1134/S0026261714020064>.
78. *Field J.A., Jong E. D., Feijoo-Costa G., Bont J.A.M.* Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotechnology*. 1993. V. 11 (2). P. 44–49. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90121-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90121-O).

79. *Finimundy T.C., Dillon A.J.P., Henriques J.A.P., Ely M.R.* A review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the *Lentinula edodes* mushroom. *Food and Nutrition Sciences*. 2014. V. 5 (12). P. 1095–1105. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.512119>.
80. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Электронный ресурс]. URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>.
81. *Fowler A., Toner M.* Cryo-Injury and Biopreservation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005. V. 1066. P. 119–135. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.010>.
82. *Furlani R.P.Z., Godoy H.T.* Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. *Food Chemistry*. 2008. V. 106 (2). P. 816–819. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.007>.
83. *Galvao J., Davis B., Tilley M., Normando E., Duchon M.R., Cordeiro M.F.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*. 2014. V. 28 (3). P. 1317–1330. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>.
84. *Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V., Wu R.J.* Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. V. 99 (25). P. 15898–15903. <https://doi.org/10.1073/pnas.252637799>.
85. *Gqsecka M., Magdziak Z., Siwulski M., Mleczek M.* Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. *European Food Research and Technology*. 2018. V. 244. P. 259–268. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2952-9>.
86. *González A., Atienza V., Montoro A., Soriano J.M.* Use of *Ganoderma lucidum* (Ganodermataceae, Basidiomycota) as radioprotector. *Nutrients*. 2020. V. 12 (4). <https://doi.org/10.3390/nu12041143>.
87. *Gregori A., Švagelj M., Pohleven J.* Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*. 2007. V. 45 (3). P. 238–249.

88. Hoffmann P. Cryopreservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1991. V. 7 (1). P. 92-94. <https://doi.org/10.1007/BF02310923>.
89. Homolka L. Methods of Cryopreservation in Fungi. In: V.K. Gupta, M.G. Tuohy, M. Ayyachamy, K.M. Turner, A. O'Donovan (eds.). *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*. Springer, New York, 2013. P. 9–16. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_2.
90. Homolka L. Preservation of live cultures of basidiomycetes – Recent methods. *Fungal biology*. 2014. V. 118 (2). P. 107–125. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.002>.
91. Homolka L., Lisá L. Long-term Maintenance of Fungal Cultures on Perlite in Cryovials – an Alternative for Agar Slants. *Folia Microbiologica*. 2008. V. 53 (6). P. 534–536. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0084-0>.
92. Homolka L., Lisá L., Eichlerová I., Nerud F. Cryopreservation of basidiomycete strains using perlite. *Journal of Microbiological Methods*. 2001. V. 47 (3). P. 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00338-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00338-4).
93. Homolka L., Lisa L., Kubátová A., Váňová M., Janderová B., Nerud F. Cryopreservation of filamentous micromycetes and yeasts using perlite. *Folia Microbiologica*. 2007. V. 52 (2). P. 153–157. <https://doi.org/10.1007/BF02932154>.
94. Homolka L., Lisá L., Nerud F. Viability of basidiomycete strains after cryopreservation: comparison of two different freezing protocols. *Folia Microbiologica*. 2003. V. 48 (2). P. 219–226. <https://doi.org/10.1007/bf02930959>.
95. Homolka L., Lisá L., Nerud F. Basidiomycete cryopreservation on perlite: Evaluation of a new method. *Cryobiology*. 2006. V. 52 (3). P. 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.02.003>.
96. Hu Z., Du R., Xiu L., Bian Z., Ma C., Sato N., Hattori M., Zhang H., Liang Y., Yu S., Wang X. Protective effect of triterpenes of *Ganoderma lucidum* on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and acute liver injury. *Cytokine*. 2020. V. 127. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154917>.
97. Hu S.H., Liang Z.C., Chia Y.C., Lien J.L., Chen K.S., Lee M.Y., Wang J.C. Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus*

- citrinopileatus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. V. 54 (6). P. 2103–2110. <https://doi.org/10.1021/jf052890d>.
98. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003. V. 46. (3). P. 205–229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4).
99. Hubálek Z., Kocková-Kratochvilová A. Liquid nitrogen storage of yeast cultures I. Survival, and literature review of the preservation of fungi at ultralow temperatures. Antonie van Leeuwenhoek. 1978. V. 44 (2). P. 229–241. <https://doi.org/10.1007/BF00643225>.
100. Humber R.A. Fungi: preservation of cultures. In: L.A. Lacey (ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, 1997. P. 269–279. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50015-4>.
101. Huss M.J. Application of a Modified Ziehl-Neelsen's Carbol-Fuchsin Stain for Observing Nuclei in Vegetative Hyphae of the Puffball Species *Lycoperdon pyriforme*. Journal of the Arkansas Academy of Science. 1996. V. 50 (1). P. 70–74.
102. Hwang S.W. Effects of Ultra-Low Temperatures on the Viability of Selected Fungus Strains. Mycologia. 1960. V. 52 (3). P. 527–529. <https://doi.org/10.2307/3755974>.
103. Hwang S.W. Long-Term Preservation of Fungus Cultures with Liquid Nitrogen Refrigeration. Applied Microbiology. 1966. V. 14 (5). P. 784–788. <https://doi.org/10.1128/am.14.5.784-788.1966>.
104. Hwang S.W. Investigation of Ultra-Low Temperature for Fungal Cultures. I. An Evaluation of Liquid-Nitrogen Storage for Preservation of Selected Fungal Cultures. Mycologia. 1968. V. 60 (3). P. 613–621. <https://doi.org/10.1080/00275514.1968.12018610>.
105. Ito T., Nakagiri A. Viability of Frozen Cultures of Basidiomycetes after Fifteen-Year Storage. Microbiology and Culture Collections. 1996. V. 12 (2). P. 67–78.
106. Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Yeremina S.S., Ozerskaya S.M. Experience in using modern methods of long-term storage of mushrooms in the All-Russian

- Collection of Microorganisms. Mikologiya i fitopatologiya. 2010. V. 44 (1). P. 19–30 (In Russ.).
107. *Jahani M., Noroznezhad F., Mansouri K.* Arginine: Challenges and opportunities of this two-faced molecule in cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018. V. 102. P. 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.109>.
 108. *Jiang M., Zhu M., Wang L., Yu S.* Anti-tumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019. V. 120. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109506>.
 109. *Jong S.C., Birmingham J.M.* Cultivation and Preservation of Fungi in Culture. In: *D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin, P.A. Lemke (eds.). The Mycota, volume 7B. Systematics and Evolution.* Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. P. 193–202. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10189-6_7.
 110. *Johnson G.C., Martin A.K.* Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under oil. *Canadian Journal of Microbiology*. 1992. V. 38 (8). P. 861–864. <https://doi.org/10.1139/m92-140>.
 111. *Jorge J.A., Polizeli M.D.L.T.M., Thevelein J.M., Terenzi H.F.* Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 1997. V. 154 (2). P. 165–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12639.x>.
 112. *Kadnikova I.A., Costa R., Kalenik T.K., Guruleva O.N., Yanguo S.* Chemical composition and nutritional value of the mushroom *Auricularia auricula-judae*. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2015. V. 3 (8). P. 478–482.
 113. *Kalač P.* A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012. V. 93 (2). P. 209–218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5960>.
 114. *Karlsson J.O., Cravalho E.G., Borel Rinkes I.H., Tompkins R.G., Yarmush M.L., Toner M.* Nucleation and Growth of Ice Crystals Inside Cultured Hepatocytes During Freezing in the Presence of Dimethyl Sulfoxide. *Biophysical Journal*. 1993. V. 65 (6). P. 2524–2536. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81319-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81319-5).
 115. *Keuls M.* The use of the „studentized range” in connection with an analysis of variance. *Euphytica*. 1952. V. 1. P. 112–122. <https://doi.org/10.1007/BF01908269>.

116. Khan M.A., Tania M. Nutritional and Medicinal Importance of *Pleurotus* Mushrooms: An Overview. *Food Reviews International*. 2012. V. 28 (3). P. 313–329. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.637267>.
117. Kim J.Y., Woo E.E., Lee I.K., Yun B.S. New antioxidants from the culture broth of *Hericium coralloides*. *The Journal of Antibiotics*. 2018. V. 71. P. 822–825. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0067-6>.
118. Kitamoto Y., Suzuki A., Shimada S., Yamanaka K. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*. 2002. V. 43. P. 143–149. <https://doi.org/10.1007/s102670200021>.
119. Kolesnikov A.I., Li J., Parker F., Eccleston R.S., Loong C.-K. Vibrational dynamics of amorphous ice. *Physical Review B*. 1999. V. 59 (5). <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.59.3569>.
120. Kolkowski J.A., Smith D. Cryopreservation and Freeze-Drying of Fungi. In: J.G. Day, M.R. McLellan (eds.). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 38. Humana Press, New Jersey, 1995. P. 49–61. <https://doi.org/10.1385/0-89603-296-5:49>.
121. Kowieska A., Lubowicki R., Jaskowska I. Chemical composition and nutritional characteristics of several cereal grain. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*. 2011. V. 10 (2). P. 37–50.
122. Kulikova N.A., Klein O.I., Pivchenko D.V., Landesman E.O., Pozdnyakova N.N., Turkovskaya O.V., Zaichik B.Ts. Ruzhitskii A.O., Koroleva O.V. Oil degradation by basidiomycetes in soil and peat at low temperatures. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. V. 52 (6). P. 629–637. <http://doi.org/10.1134/S0003683816060119>.
123. Lalaymia I., Cranenbrouck S., Declerck S. Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2014. V. 24. P. 323–337. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0541-8>.
124. Lee S.B., Milgroom M.G., Taylor J.W. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Reports*. 1988. V. 35 (11). P. 23–24.

125. Lee J.K., Park K.S., Park S., Park H., Song Y.H., Kang S.H., Kim H.J. An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast. *Cryobiology*. 2010. V. 60 (2). P. 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.01.002>.
126. Leibo S.P. Cryobiology: Preservation of Mammalian Embryos. In: J.W. Evans, A. Hollaender, C.M. Wilson (eds.). *Genetic Engineering of Animals, An Agricultural Perspective*. – Springer, New York, 1986. P. 251–272. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5110-8_21.
127. Li C.H., Chen P.Y., Chang U.M., Kan L.S., Fang W.H., Tsai K.S., Lin S.B. Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life Sciences*. 2005. V. 77 (3). P. 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.045>.
128. Li I.C., Lee L.Y., Tzeng T.T., Chen W.P., Chen Y.P., Shiao Y.J., Chen C.C. Neurohealth Properties of *Hericium erinaceus* Mycelia Enriched with Erinacines. *Behavioural Neurology*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5802634>.
129. Li L.N., Wang L., Guo X.L. Chemical constituents from the culture of the fungus *Hericium flagellum*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2019. V. 21 (8). P. 735–741. <https://doi.org/10.1080/10286020.2018.1483346>.
130. Linde G.A., Luciani A., Lopes A.D., do Valle J.S., Colauto N.B. Long-term cryopreservation of basidiomycetes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018. V. 49 (2). P. 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.004>.
131. Liu J., Du C., Wang Y., Yu Z. Anti-fatigue activities of polysaccharides extracted from *Hericium erinaceus*. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015. V. 9 (2). P. 483–487. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.2139>.
132. Liu J., Jia L., Kan J., Jin C. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology*. 2013. V. 51. P. 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.014>.
133. Liu B., Liu J., Ju M., Li X., Wang P. Bacteria-white-rot fungi joint remediation of petroleum-contaminated soil based on sustained-release of laccase. *RSC Advances*. 2017. V. 7 (62). P. 39075–39081. <https://doi.org/10.1039/C7RA06962F>.

134. Liu L., Li H., Liu Y., Li Y., Wang H. Whole Transcriptome Analysis Provides Insights Into the Molecular Mechanisms of Chlamydospore-Like Cell Formation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Frontiers in Microbiology*. 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.527389>.
135. Liu X., Yuan J.P., Chung C.K., Chen X.J. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. *Cancer Letters*. 2002. V. 182 (2). P. 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00080-0).
136. Lladó S., Covino S., Solanas A.M., Viñas M., Petruccioli M., D'annibale A. Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*. 2013. V. 248. P. 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.020>.
137. Lodge D.J., Ammirati J.F., O'Dell T.E., Mueller G.M., Huhndorf S.M., Wang C., Stokland J.N., Schmit J.P., Ryvarden L., Leacock P.R., Mata M., Umana L., Wu Q., Czederpiltz D.L. Terrestrial and Lignicolous Macrofungi. In: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds.). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, 1st edn. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004. P. 127–172. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50011-8>.
138. Lovelock J.E. Het mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1953a. V. 11. P. 28–36. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90005-5).
139. Lovelock J.E. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1953b. V. 10. P. 414–426. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90273-X](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90273-X).
140. Lv H., Kong Y., Yao Q., Zhang B., Leng F.W., Bian H.J., Balzarini J., Van Damme E., Bao J.K. Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects. *Phytomedicine*. 2009. V. 16 (2). P. 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.07.004>.

141. Ma H.T., Hsieh J.F., Chen S.T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 2015. V. 114. P. 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.017>.
142. Ma G., Yang W., Mariga A.M., Fang Y., Ma N., Pei F., Hu Q. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. *Carbohydrate Polymers*. 2014. V. 114. P. 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.069>.
143. MacGregor W.S. The chemical and physical properties of DMSO. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1967. V. 141 (1). P. 3–12. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1967.tb34860.x>.
144. Mahmud S.A., Nagahisa K., Hirasawa T., Yoshikawa K., Ashitani K., Shimizu H. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2009. V. 26 (1). P. 17–30. <https://doi.org/10.1002/yea.1646>.
145. Maia S.C., Toledo R.C.C., Almeida A.P.M.M., da Silva R., Rinker D.L., Dias E.S. Low-cost and low maintenance preservation of *Agaricus brasiliensis* cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. V. 28. P. 2411–2416. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1050-1>.
146. Mandumpal J.B., Kreck C.A., Mancera R.L. A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011. V. 13. P. 3839–3842. <https://doi.org/10.1039/C0CP02326D>.
147. Mantovani T.R.D., Tanaka H.S., Umeo S.H., Zaghi L.L. Jr., do Valle J.S., Paccola-Meirelles L.D., Linde G.A., Colauto N.B. Cryopreservation at –20 and –70 °C of *Pleurotus ostreatus* on grains. *Indian Journal of Microbiology*. 2012. V. 52 (3). P. 484–488. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0289-4>.
148. Marco-Urrea E., Gabarell X., Sarrà M., Caminal G., Vicent T., Reddy C.A. Novel aerobic perchloroethylene degradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Environmental Science & Technology*. 2006. V. 40 (24). P. 7796–7802. <https://doi.org/10.1021/es0622958>.
149. Marco-Urrea E., Aranda E., Caminal G., Guillén F. Induction of hydroxyl radical production in *Trametes versicolor* to degrade recalcitrant chlorinated

- hydrocarbons. *Bioresource Technology*. 2009. V. 100 (23). P. 5757–5762. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.078>.
150. *Marsola S.J., Jorge L.F., Meniqueti A.B., Bertéli M.B.D., de Lima T.E.F., Bezerra J.L., Lopes A.D., Gazim Z.C., do Valle J.S., Colauto N.B., Linde G.A.* Endophytic fungi of *Brunfelsia uniflora*: isolation, cryopreservation, and determination of enzymatic and antioxidant activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022. V. 38 (6). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03278-5>.
 151. *Mason B.J., Bryant G.W., Van den Heuvel A.P.* The growth habits and surface structure of ice crystals. *Philosophical Magazine*. 1963. V. 8 (87). P. 505–526. <https://doi.org/10.1080/14786436308211150>.
 152. *Mata G., Estrada A.E.R.* Viability in spawn stocks of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*, after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. *Journal of Agricultural Technology*. 2005. V. 1. P. 153–162.
 153. *Mata G., Pérez-Merlo R.* Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. *Cryobiology*. 2003. V. 47 (1). P. 14–20. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00064-6).
 154. *Mattila P., Könkö K., Eurola M., Pihlava J.M., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V.* Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. V. 49 (5). P. 2343–2348. <https://doi.org/10.1021/jf001525d>.
 155. *Mazur P.* Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *The Journal of General Physiology*. 1963. V. 47 (2). P. 347–369. <https://doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>.
 156. *Mazur P.* A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. *Cryobiology*. 2010. V. 60 (1). P. 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.12.001>.
 157. *Mazur P., Rall W.F., Leibo S.P.* Kinetics of Water Loss and the Likelihood of Intracellular Freezing in Mouse Ova. *Cell Biophysics*. 1984. V. 6. P. 197–213. <https://doi.org/10.1007/BF02788619>.

158. Mazur P., Schneider U., Mahowald A.P. Characteristics and Kinetics of Subzero Chilling Injury in *Drosophila* Embryos. *Cryobiology*. 1992. V. 29 (1). P. 39–68. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90005-M](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90005-M).
159. McGinnis M.R., Padhye A.A., Ajello L. Storage of Stock Cultures of Filamentous Fungi, Yeasts, and Some Aerobic Actinomycetes in Sterile Distilled Water. *Applied Microbiology*. 1974. V. 28 (2). P. 218–222. <https://doi.org/10.1128/am.28.2.218-222.1974>.
160. Momose Y., Matsumoto R., Maruyama A., Yamaoka M. Comparative analysis of transcriptional responses to the cryoprotectants, dimethyl sulfoxide and trehalose, which confer tolerance to freeze–thaw stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*. 2010. V. 60 (3). P. 245–261. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.01.001>.
161. Morris G.J., Smith D., Coulson G.E. A Comparative Study of the Changes in the Morphology of Hyphae during Freezing and Viability upon Thawing for Twenty Species of Fungi. *Microbiology*. 1988. V. 134 (11). P. 2897–2906. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-11-2897>.
162. Mueller G.M., Schmit J.P., Leacock P.R., Buyck B., Cifuentes J., Desjardin D.E., Halling R.E., Hjortsam K., Iturriaga T., Larsson K.H., Lodge D.J., May T.W., Minter D., Rajchenberg M., Redhead S.A., Ryvarden L., Trappe J.M., Watling R., Wu Q. Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation*. 2007. V. 16. P. 37–48. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9108-8>.
163. Muszyńska B., Kała K., Rojowski J., Grzywacz A., Opoka W. Composition and Biological Properties of *Agaricus bisporus* Fruiting Bodies – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2017. V. 67 (3). P. 173–181. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2016-0032>.
164. Nagano M., Shimizu K., Kondo R., Hayashi C., Sato D., Kitagawa K., Ohnuki K. Reduction of depression and anxiety by 4 weeks *Hericium erinaceus* intake. *Biomedical Research*. 2010. V. 31 (4). P. 231–237. <https://doi.org/10.2220/biomedres.31.231>.

165. Nakasone K.K., Peterson S.W., Jong S.C. Preservation and Distribution of Fungal Cultures. In: G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster (eds.). Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, 1st edn. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004. P. 37–47. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50006-4>.
166. Nedele A.K., Gross S., Rigling M., Zhang Y. Reduction of green off-flavor compounds: Comparison of key odorants during fermentation of soy drink with *Lycoperdon pyriforme*. Food Chemistry. 2021. V. 334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127591>.
167. Newman D. The distribution of range in samples from a normal population, expressed in terms of an independent estimate of standard deviation. Biometrika. 1939. V. 31 (1/2). P. 20–30. <https://doi.org/10.2307/2334973>.
168. Ntougias S., Baldrian P., Ehaliotis C., Nerud F., Merhautová V., Zervakis G.I. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi – Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. Bioresource Technology. 2015. V. 189. P. 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.149>.
169. Olien C.R., Smith M.N. Extension of Localized Freeze Injury in Barley by Acute Post-Thaw Bacterial Disease. Cryobiology. 1981. V. 18 (4). P. 404–409. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(81\)90114-0](https://doi.org/10.1016/0011-2240(81)90114-0).
170. Onions A.H.S. Preservation of Fungi. In: C. Booth (ed.). Methods in Microbiology. Volume 4. Academic Press, London, 1971. P. 113–151. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(09\)70009-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(09)70009-1).
171. Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Eremina S.S., Vasilenko A.N., Chigineva N.I. Long-Term Preservation of Fungal Cultures in All-Russian Collection of Microorganisms (VKM): Protocols and Results. In: V.K. Gupta, M.G. Tuohy, M. Ayyachamy, K.M. Turner, A. O'Donovan (eds.). Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology. Springer, New York, 2013. P. 17–65. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_3.
172. Palacio A., Gutiérrez Y., Rojas D., Atehortúa L., Zapata P. Viability of Basidiomycete fungal strains under different conservation methods:

- cryopreservation vs. freeze-drying processes. *Actualidades Biológicas*. 2014. V. 36 (100). P. 13–21.
173. Panoff J.M., Thammavongs B., Guéguen M. Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze–thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology*. 2000. V. 40 (3). P. 264–269. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2240>.
174. Park Y.J., Lee C.S., Kong W.S. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic machinery of *Flammulina rossica*. *Microorganisms*. 2019. V. 7 (10). <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7100421>.
175. Patel Y., Naraian R., Singh V.K. Medicinal Properties of *Pleurotus* species (Oyster Mushroom): A Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*. 2012. V. 3 (1). P. 1–12.
176. Patist A., Zoerb H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosyllstems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005. V. 40 (2). P. 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.05.003>.
177. Pegg D.E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*. 2010. V. 60 (3). P. 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.02.003>.
178. Perevedentseva L. Use of wild-growing mushrooms for therapeutic purposes in the Perm Territory, Russia. *Journal of Environmental Science and Engineering*. A. 2013. V. 2 (4). P. 236–242.
179. Perrin P.W. Long-Term Storage of Cultures of Wood-Inhabiting Fungi Under Mineral Oil. *Mycologia*. 1979. V. 71 (4). P. 867–869. <https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021086>.
180. Pillai T.G., Nair C.K.K., Janardhanan K.K. Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern parts of India, protects radiation induced damages both *in vitro* and *in vivo*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2008. V. 26 (1). P. 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.02.004>.
181. Pozdnyakova N.N., Nikitina V.E., Turovskaya O.V. Bioremediation of Oil-Polluted Soil with an Association Including the Fungus *Pleurotus ostreatus* and Soil

- Microflora. Applied Biochemistry and Microbiology. 2008. V. 44 (1). P. 60–65.
<https://doi.org/10.1134/S0003683808010109>.
182. *Psurtseva N.V., Kiyashko A.A., Senik S.V.* Basidial fungi of the Botanical Garden of the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences in pure culture. In: Botanika: istoriya, teoriya, praktika (k 300-letiyu osnovaniya Botanicheskogo instituta im. V. L. Komarova Rossiyskoy akademii nauk): Trudy mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii. Saint Petersburg, 2014. P. 260 (in Russ.).
 183. *Purnomo A.S., Mori T., Takagi K., Kondo R.* Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi. International Biodeterioration & Biodegradation. 2011. V. 65 (5). P. 691–695.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.004>.
 184. *Rai R.D.* Production of Edible Fungi. In: *D.K. Arora, P.D. Bridge, D. Bhatnagar* (eds.). Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. Marcel Dekker, Inc., New York, 2004. P. 382–404.
 185. *Rammler D.H., Zaffaroni A.* Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. Annals of the New York Academy of Sciences. 1967. V. 141 (1). P. 13–23. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1967.tb34861.x>.
 186. *Randhawa M.A.* Dimethyl sulfoxide (DMSO) inhibits the germination of *Candida albicans* and the arthrospores of *Trichophyton mentagrophytes*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2008. V. 49 (2). P. 125–128. <https://doi.org/10.3314/jjmm.49.125>.
 187. *Raprior S., Breheret S., Talou T., Bessière J.M.* Volatile flavor constituents of fresh *Mycetinis alliaceus* (garlic *Mycetinis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997. V. 45 (3). P. 820–825. <https://doi.org/10.1021/jf960511y>.
 188. *Reid I.D., Paice M.G.* Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. FEMS Microbiology Reviews. 1994. V. 13 (2-3). P. 369–375.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00056.x>.
 189. *Ribeiro M.J.S., Leão L.S.C., Morais P.B., Rosa C.A., Panek A.D.* Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. Antonie van Leeuwenhoek. 1999. V. 75 (3). P. 245–251.
<https://doi.org/10.1023/a:1001806012566>.

190. *Ribeiro B., Valentao P., Baptista P., Seabra R.M., Andrade P.B.* Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*. 2007. V. 45 (10). P. 1805–1813.
191. *Richter D.L., Kangas L.C., Smith J.K., Laks P.E.* Comparison of effectiveness of wood decay fungi maintained by annual subculture on agar and stored in sterile water for 18 years. *Canadian Journal of Microbiology*. 2010. V. 56. P. 268–271. <https://doi.org/10.1139/W10-001>.
192. *Richter D.L.* Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 20 years in cold storage in sterile water. *Canadian Journal of Microbiology*. 2008. V. 54. P. 595–599. <https://doi.org/10.1139/W08-049>.
193. *Richter D.L., Dixon T.G., Smith J.K.* Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 30 years in cold storage in sterile water. *Canadian Journal of Microbiology*. 2016. V. 62. P. 932–937. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0272>.
194. *Rodríguez-Rodríguez C.E., Castro-Gutiérrez V., Chin-Pampillo J.S., Ruiz-Hidalgo K.* On-farm biopurification systems: role of white rot fungi in depuration of pesticide-containing wastewaters. *FEMS Microbiology Letters*. 2013. V. 345 (1). <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12161>.
195. *Rosales E., Pazos M., Ángeles Sanromán M.* Feasibility of Solid-State Fermentation Using Spent Fungi-Substrate in the Biodegradation of PAHs. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 2013. V. 41 (6). P. 610–615. <http://doi.org/10.1002/clen.201100305>.
196. *Rubinsky B., Pegg D.E., Calne R.Y.* A mathematical model for the freezing process in biological tissue. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1988. V. 234 (1276). P. 343–358. <https://doi.org/10.1098/rspb.1988.0053>.
197. *Ryan M.J., Smith D.* Cryopreservation and Freeze-Drying of Fungi Employing Centrifugal and Shelf Freeze-Drying. In: *J.G. Day, G.N. Stacey (eds.). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology*.

- Humana Press, Totowa, 2007. P. 127–140. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_9.
198. Saharan R.K., Sharma S.C. Correlation studies of trehalose with oxidative stress in ethanol stressed yeast *Pachysolen tannophilus*. Current Research Journal of Biological Sciences. 2010. V. 2 (5). P. 300–305.
 199. Sakurai K., Yuasa M., Ohji S., Hosoyama A., Sato M., Fujita N., Kawasaki H. Gene Mutations in *Ganoderma lucidum* During Long-Term Preservation by Repeated Subculturing. Biopreservation and Biobanking. 2019. V. 17 (5). P. 395–400. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0149>.
 200. Salzmann C.G., Loveday J.S., Rosu-Finsen A., Bull C.L. Structure and nature of ice XIX. Nature Communications. 2021. V. 12. P. 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23399-z>.
 201. Samšišňáková A., Kálalová S. The influence of a single-spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology. 1983. V. 42 (2). P. 156–161. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90057-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90057-5).
 202. Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology Advances. 2009. V. 27 (2). P. 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>.
 203. Sanodiya B.S., Thakur G.S., Baghel R.K., Prasad G.B.K.S., Bisen P.S. *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2009. V. 10 (8). P. 717–742. <https://doi.org/10.2174/138920109789978757>.
 204. Sato M., Sukenobe J., Nakagiri A. Cryopreservation of cryosensitive basidiomycete cultures by application and modification of perlite protocol. CryoLetters. 2012. V. 33 (2). P. 86–94.
 205. Sato M., Inaba S., Sukenobe J., Sasaki T., Inoue R., Noguchi M., Nakagiri A. A modified perlite protocol with a mixed dimethyl sulfoxide and trehalose cryoprotectant improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal

- basidiomycetes. *Mycologia*. 2019. V. 111 (1). P. 161–176.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1520035>.
206. *Sato M., Inaba S., Noguchi M., Nakagiri A.* Vermiculite as a culture substrate greatly improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal basidiomycetes. *Fungal Biology*. 2020. V. 124 (8). P. 742–751.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.05.002>.
207. *Seddon P.J., Armstrong D.P., Maloney R.F.* Developing the science of reintroduction biology. *Conservation biology*. 2007. V. 21 (2). P. 303–312.
208. *Sehgal O.P., Das P.D.* Effect of freezing on conformation and stability of the virions of southern bean mosaic virus. *Virology*. 1975. V. 64 (1). P. 180–186.
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90090-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90090-2).
209. *Semwal D.K., Semwal R.B., Combrinck S., Viljoen A.* Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients*. 2016. V. 8 (2).
<https://doi.org/10.3390/nu8020090>.
210. *Shrestha B., Zhang W., Zhang Y., Liu X.* The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. *Mycological Progress*. 2012. V. 11. P. 599–614. <https://doi.org/10.1007/s11557-012-0825-y>.
211. *Singh S.K., Singh P.N., Gaikwad S.B., Maurya D.K.* Conservation of Fungi: A Review on Conventional Approaches. In: *S.K. Sharma, A. Varma* (eds.). *Microbial Resource Conservation: Conventional to Modern Approaches*. Springer, Cham, 2018. P. 223–237. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_8.
212. *Singh S.K., Upadhyay R.C., Kamal S., Tiwari M.* Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability. *CryoLetters*. 2004a. V. 25 (1). P. 23–32.
213. *Singh S.K., Baghela A.* Cryopreservation of Microorganisms. In: *A. Varma, A.K. Sharma* (eds.). *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes*. Springer, Cham, 2017. P. 321–333. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4_21.
214. *Singh S.K., Upadhyay R.C., Yadav M.C., Tiwari M.* Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *Current Science*. 2004b. V. 87 (5). P. 568–570.

215. *Smina T.P., Joseph J., Janardhanan K.K. Ganoderma lucidum* total triterpenes prevent γ -radiation induced oxidative stress in Swiss albino mice *in vivo*. Redox Report. 2016. V. 21 (6). P. 254–261. <https://doi.org/10.1080/13510002.2015.1126098>.
216. *Smith D.* The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi. CryoLetters. 1998. V. 19 (2). P. 79–90.
217. *Smith D., Onions A.H.S.* A comparison of some preservation techniques for fungi. Transactions of the British Mycological Society. 1983. V. 81 (3). P. 535–540. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80122-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80122-3).
218. *Smith D., Thomas V.E.* Cryogenic light microscopy and the development of cooling protocols for the cryopreservation of filamentous fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1997. V. 14. P. 49–57. <https://doi.org/10.1023/A:1008820432471>.
219. *Sodeyama K., Sakka Y., Kamino Y., Seki H.* Preparation of fine expanded perlite. Journal of Materials Science. 1999. V. 34. P. 2461–2468. <https://doi.org/10.1023/A:1004579120164>.
220. *Šramková Z., Gregová E., Šturdík E.* Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. Acta Chimica Slovaca. 2009. V. 2 (1). P. 115–138.
221. *Stalpers J.A.* Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1978. 248 p.
222. *Stalpers J.A., Hoog A., Vlug I.J.* Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. Mycologia. 1987. V. 79 (1). P. 82–89. <https://doi.org/10.2307/3807747>.
223. *Stebbins M.E., Robbins W.J.* Mineral Oil and Preservation of Fungous Cultures. Mycologia. 1949. V. 41 (6). P. 632–636. <https://doi.org/10.1080/00275514.1949.12017806>.
224. *Stielow J.B., Vaas L.A.I., Göker M., Hoffman P., Klenk H.P.* Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic Basidiomycota and Ascomycota. Mycologia. 2012. V. 104 (1). P. 324–330. <https://doi.org/10.3852/11-155>.

225. Stoychev I., Homolka L., Nerud G., Lisá L. Activities of ligninolytic enzymes in some white-rot basidiomycete strains after recovering from cryopreservation in liquid nitrogen. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998. V. 73. P. 211–214. <https://doi.org/10.1023/A:1000837719510>.
226. Sundari S.K., Adholeya A. Freeze-drying vegetative mycelium of *Laccaria fraterna* and its subsequent regeneration. *Biotechnology Techniques*. 1999. V. 13. P. 491–495. <https://doi.org/10.1023/A:1008937719759>.
227. Sundari S.K., Adholeya A. Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2000a. V. 16 (4). P. 373–376. <https://doi.org/10.1023/A:1008984700163>.
228. Sundari S.K., Adholeya A. Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates: part II. Enzymes acting upon carbon compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2000b. V. 16 (8). P. 865–868. <https://doi.org/10.1023/A:1008921419630>.
229. Tan C.S., van Ingen C.W., Stalpers J.A. Freeze-drying of fungal hyphae and stability of the product. In: L.J.L.D. van Griensven (ed.). *Genetics and Breeding of Agaricus*. Pudoc, Wageningen, 1991. P. 25–30.
230. Tan M., Mei J., Xie J. The Formation and Control of Ice Crystal and Its Impact on the Quality of Frozen Aquatic Products: A Review. *Crystals*. 2021. V. 11 (1). <https://doi.org/10.3390/cryst11010068>.
231. Tanaka H.S., Mantovani T.R.D., dos Santos M.P., Linde G.A., Colauto N.B. Cereal grains and glycerol in *Agaricus blazei* cryopreservation. *Bioscience Journal*. 2013. V. 29 (3). P. 627–633.
232. Tang W., Liu J.W., Zhao W.M., Wei D.Z., Zhong J.J. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sciences*. 2006. V. 80 (3). P. 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.09.001>.

233. *Tao D., Li P.H.* Classification of plant cell cryoprotectants. *Journal of Theoretical Biology.* 1986. V. 123 (3). P. 305–310. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(86\)80245-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(86)80245-4).
234. *Tchounwou C.K., Yedjou C.G., Farah I., Tchounwou P.B.* D-Glucose-Induced Cytotoxic, Genotoxic, and Apoptotic Effects on Human Breast Adenocarcinoma (MCF-7) Cells. *Journal of Cancer Science & Therapy.* 2014. V. 6 (5). P. 156–160. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000265>.
235. *Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Kotlova E.R.* The influence of various thermal effects on the composition of membrane lipids and cytosol carbohydrates in filamentous fungi. *Mikrobiologiya.* 2011. V. 80 (4). P. 447–453 (In Russ.).
236. *Tesauro M., Mazzotta F.A.* Pathophysiology of diabetes. In: *G. Orlando, L. Piemonti, C. Ricordi, R.J. Stratta, R.W.G. Gruessner* (eds.). *Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas*, vol. 1. Elsevier Academic Press, 2020. P. 37–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814833-4.00003-4>.
237. *Tomizawa M.M., Dias E.S., de Assis L.J., Gomide P.H.O., dos Santos J.B.* Genetic variability of mushroom isolates *Agaricus blazei* using markers RAPD. *Ciência e Agrotecnologia.* 2007. V. 31 (4). P. 1242–1249. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000400045>.
238. *Tukey J.W.* Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics.* 1949. P. 99–114.
239. *Turkovskaya O.V., Pozdnyakova N.N.* Features of the use of mushrooms in environmental biotechnologies. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN.* 2018. V. 3 (5). P. 60–66 (In Russ.).
240. *Typke V.* The r_s structure of DMSO, revisited. *Journal of Molecular Structure.* 1996. V. 384 (1). P. 35–40. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(96\)09313-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(96)09313-1).
241. *Vetter J.* Biological values of cultivated mushrooms – a review. *Acta Alimentaria.* 2019. V. 48 (2). P. 229–240. <https://doi.org/10.1556/066.2019.48.2.11>.
242. *Voyron S., Roussel S., Munaut F., Varese G.C., Ginepro M., Declerck S., Marchisio V.F.* Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following

- different methods of preservation. *Mycological Research*. 2009. V. 113 (10). P. 1027–1038. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.006>.
243. Wang J.C., Hu S.H., Wang J.T., Chen K.S., Chia Y.C. Hypoglycemic effect of extract of *Hericium erinaceus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005. V. 85 (4). P. 641–646. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1928>.
 244. Wang Z., Luo D., Liang Z. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers. *Carbohydrate Polymers*. 2004. V. 57 (3). P. 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.018>.
 245. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1999. V. 1 (1). <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.30>.
 246. Wessels J.G.H. Fruiting in the Higher Fungi. *Advances in Microbial Physiology*. 1993. V. 34. P. 147–202. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60029-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60029-6).
 247. Whalley E., Klug D.D., Handa Y.P. Entropy of amorphous ice. *Nature*. 1989. V. 342. P. 782–783. <https://doi.org/10.1038/342782a0>.
 248. Wolfe J., Bryant G. Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane–Solute–Water Systems. *Cryobiology*. 1999. V. 39 (2). P. 103–129. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2195>.
 249. Wolkers W.F., Oldenhof H. Principles Underlying Cryopreservation and Freeze-Drying of Cells and Tissues. In: W.F. Wolkers, H. Oldenhof (eds.). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press, New York, 2021. P. 3–25. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_1.
 250. Xia J., Dai L., Wang L., Zhu J. Ganoderic acid DM induces autophagic apoptosis in non-small cell lung cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR activity. *Chemico-Biological interactions*. 2020. V. 316. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108932>.
 251. Xiao N., Suzuki K., Nishimiya Y., Kondo H., Miura A., Tsuda S., Hoshino T. Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from

- Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*. The FEBS Journal. 2010. V. 277 (2). P. 394–403. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07490.x>.
252. Yang Z., Xu J., Fu Q., Fu X., Shu T., Bi Y., Song B. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. Carbohydrate Polymers. 2013. V. 95 (2). P. 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.024>.
253. Yoon S.J., Yu M.A., Pyun Y.R., Hwang J.K., Chu D.C., Juneja L.R., Mourão P.A.S. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. Thrombosis Research. 2003. V. 112 (3). P. 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2003.10.022>.
254. Young D., Rice J., Martin R., Lindquist E., Lipzen A., Grigoriev I., Hibbett D. Degradation of Bunker C Fuel Oil by White-Rot Fungi in Sawdust Cultures Suggests Potential Applications in Bioremediation. PloS ONE. 2015. V. 10 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130381>.
255. Zaghi L.L. Jr., Lopes A.D., Cordeiro F.A., Colla I.M., Bertéli M.B.D., do Valle J.S., Linde G.A., Colauto N.B. Cryopreservation at –75 °C of *Agaricus subrufescens* on wheat grains with sucrose. Brazilian Journal of Microbiology. 2018. V. 49 (2). P. 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.003>.
256. Zaghi L.L. Jr., Bertéli M.B.D., de Freitas J.D.S., de Oliviera Filho O.B.Q., Lopes A.D., Ruiz S.P., do Valle J.S., Linde G.A., Colauto N.B. Five-year cryopreservation at –80 °C of edible and medicinal basidiomycetes by wheat grain technique. Journal of Microbiological Methods. 2020. V. 176. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106030>.
257. Zanaroli G., Di Toro S., Todaro D., Varese G.C., Bertholotto A., Fava F. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. Microbial Cell Factories. 2010. V. 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-10>.
258. Zhang Y., Geng W., Shen Y., Wang Y., Dai Y.C. Edible Mushroom Cultivation for Food Security and Rural Development in China: Bio-Innovation, Technological

- Dissemination and Marketing. Sustainability. 2014. V. 6 (5). P. 2961–2973. <https://doi.org/10.3390/su6052961>.
259. Zhao L., Dong Y., Chen G., Hu Q. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Polymers. 2010. V. 80 (3). P. 783–789. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.029>.
260. Zhu C., Gao Y., Zhu W., Liu Y., Francisco J.S., Zeng X.C. Computational Prediction of Novel Ice Phases: A Perspective. The Journal of Physical Chemistry Letters. 2020. V. 11 (17). P. 7449–7461. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.0c01635>.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Фотографии плодовых тел макромицетов.



Рис. 18. Плодовые тела *Auricularia auricula-judae* (MR16).



Рис. 19. Плодовые тела *Fistulina hepatica* (RA06).



Рис. 20. Плодовые тела *Flammulina rossica* (MR55).



Рис. 21. Плодовое тело *Ganoderma lucidum* (MR40).



Рис. 22. Плодовое тело *Hericium coralloides* (MR57).



Рис. 23. Плодовые тела *Laetiporus cretaceus* (FE29).



Рис. 24. Плодовые тела *Lentinula edodes* (FE20).



Рис. 25. Плодовые тела *Lycoperdon pyriforme* (RA03).



Рис. 26. Плодовые тела *Mucidula mucida* (FE18).

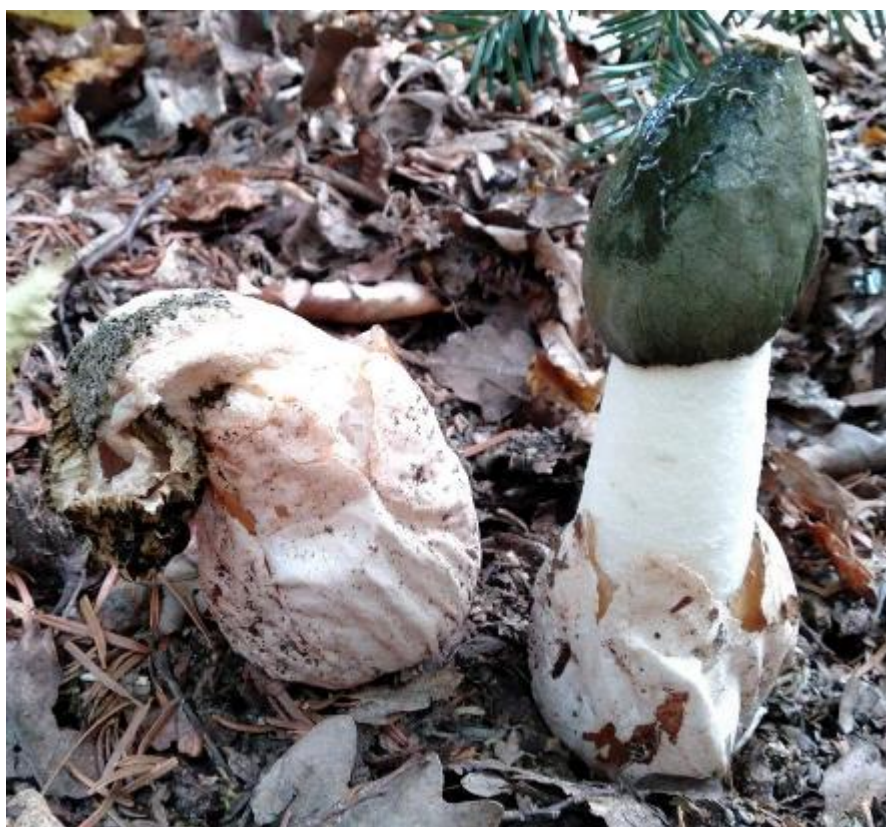


Рис. 27. Плодовые тела *Phallus impudicus* (RA01).



Рис. 28. Плодовые тела *Pleurotus ostreatus* (MR1).

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Коллекция штаммов макромицетов.

Таблица 19. Виды и штаммы базовой коллекции чистых культур макромицетов кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Штамм	Видовое название	Авторы	Регион	Район	Трофическая группа	Порядок	Отдел
MR10	<i>Agaricus bisporus</i>	(J.E. Lange) Imbach	Московская область	Одинцовский район	Hu	Agaricales	Basidiomycota
PR58	<i>Agaricus bisporus</i>	(J.E. Lange) Imbach	Промышленный штамм	—	Hu	Agaricales	Basidiomycota
FE28	<i>Agaricus campestris</i>	Linnaeus	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Hu	Agaricales	Basidiomycota
FE48	<i>Agaricus sylvicola</i>	(Vittad.) Peck	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Hu	Agaricales	Basidiomycota
MR64	<i>Armillaria cepistipes</i>	Velen.	Московская область	Одинцовский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR16	<i>Auricularia auricula-judae</i>	(Bull.) Quél.	Москва	Ленинские горы	Le	Auriculariales	Basidiomycota
MR59	<i>Auricularia auricula-judae</i>	(Bull.) Quél.	Москва	Даниловский район	Le	Auriculariales	Basidiomycota
FE25	<i>Auricularia nigricans</i>	(Sw.) Birkebak, Looney & Sánchez-García	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Auriculariales	Basidiomycota
MR67	<i>Cordyceps militaris</i>	(L.) Fr.	Московская область	Раменский район	Pin	Hypocreales	Ascomycota
RA04	<i>Fistulina hepatica</i>	(Schaeff.) With.	Майкоп	Майкопский район	Par	Agaricales	Basidiomycota
RA06	<i>Fistulina hepatica</i>	(Schaeff.) With.	Майкоп	Майкопский район	Par	Agaricales	Basidiomycota
MR44	<i>Flammula alnicola</i>	(Fr.) P. Kumm.	Москва	Ленинские горы	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR55	<i>Flammulina rossica</i>	Redhead & R.H. Petersen	Московская область	Одинцовский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR14	<i>Flammulina velutipes</i>	(Curtis) Singer	Москва	Гагаринский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR15	<i>Flammulina velutipes</i>	(Curtis) Singer	Москва	Гагаринский район	Le	Agaricales	Basidiomycota

MR58	<i>Flammulina velutipes</i>	(Curtis) Singer	Москва	Гагаринский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR6	<i>Flammulina velutipes</i>	(Curtis) Singer	Москва	Район Митино	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR7	<i>Flammulina velutipes</i>	(Curtis) Singer	Москва	Район Митино	Le	Agaricales	Basidiomycota
RB01	<i>Flammulina velutipes</i>	(Curtis) Singer	г. Минск	Фрунзенский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR39	<i>Ganoderma lucidum</i>	(Curtis) P. Karst.	Московская область	Одинцовский район	Le	Polyporales	Basidiomycota
MR40	<i>Ganoderma lucidum</i>	(Curtis) P. Karst.	Московская область	Одинцовский район	Le	Polyporales	Basidiomycota
RA08	<i>Ganoderma lucidum</i>	(Curtis) P. Karst.	Майкоп	Майкопский район	Le	Polyporales	Basidiomycota
RA05	<i>Ganoderma tsugae</i>	Murrill	Майкоп	Майкопский район	Le	Polyporales	Basidiomycota
RA07	<i>Ganoderma tsugae</i>	Murrill	Майкоп	Майкопский район	Le	Polyporales	Basidiomycota
FE47	<i>Grifola frondosa</i>	(Dicks.) Gray	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Polyporales	Basidiomycota
MR13	<i>Grifola frondosa</i>	(Dicks.) Gray	Москва	Кунцевский район	Le	Polyporales	Basidiomycota
RA11	<i>Hericium cirrhatum</i>	(Pers.) Nikol.	Майкоп	Майкопский район	Le	Russulales	Basidiomycota
MR57	<i>Hericium coralloides</i>	(Scop.) Pers.	Московская область	Рузский район	Le	Russulales	Basidiomycota
FE53	<i>Hericium erinaceus</i>	(Bull.) Pers.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Russulales	Basidiomycota
FE54	<i>Hericium erinaceus</i>	(Bull.) Pers.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Russulales	Basidiomycota
MR8	<i>Hericium erinaceus</i>	(Bull.) Pers.	Московская область	Ершово	Le	Russulales	Basidiomycota
MR9	<i>Hericium erinaceus</i>	(Bull.) Pers.	Республика Адыгея	Майкопский район	Le	Russulales	Basidiomycota
FE46	<i>Hericium flagellum</i>	(Scop.) Pers.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Russulales	Basidiomycota

RA09	<i>Hericium flagellum</i>	(Scop.) Pers.	Майкоп	Майкопский район	Le	Russulales	Basidiomycota
MR3	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	(Bull.) Singer	Москва	Ленинские горы	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR4	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	(Bull.) Singer	Москва	Ленинские горы	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR65	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	(Schaeff.) Singer & A.H. Sm.	Московская область	Одинцовский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE29	<i>Laetiporus cremeiporus</i>	Y. Ota & T. Hatt.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le, Par	Polyporales	Basidiomycota
FE52	<i>Laetiporus cremeiporus</i>	Y. Ota & T. Hatt.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le, Par	Polyporales	Basidiomycota
MR62	<i>Laetiporus sulphureus</i>	(Bull.) Murrill	Московская область	Одинцовский район	Le, Par	Polyporales	Basidiomycota
MR6	<i>Laetiporus sulphureus</i>	(Bull.) Murrill	Московская область	Одинцовский район	Le, Par	Polyporales	Basidiomycota
FE20	<i>Lentinula edodes</i>	(Berk.) Pegler	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE21	<i>Lentinula edodes</i>	(Berk.) Pegler	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE22	<i>Lentinula edodes</i>	(Berk.) Pegler	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE23	<i>Lentinula edodes</i>	(Berk.) Pegler	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR37	<i>Lepista personata</i>	(Fr.) Cooke	Москва	Ленинские горы	Hu	Agaricales	Basidiomycota
RA03	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	Schaeff.	Майкоп	Майкопский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE26	<i>Macrolepiota mastoidea</i>	(Fr.) Singer	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Hu	Agaricales	Basidiomycota
RA01	<i>Mycetinis alliaceus</i>	(Jacq.) Earle ex A.W. Wilson & Desjardin	Майкоп	Майкопский район	St	Agaricales	Basidiomycota
MR11	<i>Mycetinis scorodonius</i>	(Fr.) A.W.	Республика	Майкопский	St	Agaricales	Basidiomycota

		Wilson & Desjardin	Адыгея	район			
FE18	<i>Mucidula mucida</i>	(Schrad.) Pat.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE19	<i>Mucidula mucida</i>	(Schrad.) Pat.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE36	<i>Mucidula mucida</i>	(Schrad.) Pat.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
RA10	<i>Mucidula mucida</i>	(Schrad.) Pat.	Майкоп	Майкопский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE33	<i>Mycoleptodonoides vassiljevae</i>	Nikol.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Polyporales	Basidiomycota
FE34	<i>Mycoleptodonoides vassiljevae</i>	Nikol.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Polyporales	Basidiomycota
MR38	<i>Neolentinus lepideus</i>	(Fr.) Redhead & Ginns	Московская область	Одинцовский район	Le	Gloeophyllales	Basidiomycota
FE50	<i>Ossicaulis lignatilis</i>	(Pers.) Redhead & Ginns	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
RA02	<i>Phallus impudicus</i>	Linnaeus	Майкоп	Майкопский район	Hu	Phallales	Basidiomycota
MR43	<i>Pholiota aurivella</i>	(Batsch) P. Kumm.	Москва	Центральный городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE27	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Singer	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE51	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Singer	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Agaricales	Basidiomycota
PR62	<i>Pleurotus nebrodensis</i>	(Inzenga) Quél.	Промышленный штамм	—	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	(Jacq.) P. Kumm.	Москва	Ленинские горы	Le	Agaricales	Basidiomycota

MR2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	(Jacq.) P. Kumm.	Московская область	Одинцовский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
MR66	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	(Fr.) Quél.	Тверская область	Нелидовский район	Le	Agaricales	Basidiomycota
FE24	<i>Polyporus squamosus</i>	(Huds.) Quél.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Le	Polyporales	Basidiomycota
MR41	<i>Sarcoscypha coccinea</i>	(Gray) Boud.	Московская область	Одинцовский район	Le	Pezizales	Ascomycota
MR31	<i>Sarcosoma globosum</i>	(Schmidel) Casp.	Московская область	Истринский район	Hu	Pezizales	Ascomycota
MR3	<i>Sarcosoma globosum</i>	(Schmidel) Casp.	Московская область	Истринский район	Hu	Pezizales	Ascomycota
MR61	<i>Sarcosoma globosum</i>	(Schmidel) Casp.	Московская область	Истринский район	Hu	Pezizales	Ascomycota
FE30/ДВ21	<i>Sparassis latifolia</i>	Y.C. Dai & Zheng Wang	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Par	Polyporales	Basidiomycota
FE35	<i>Sparassis latifolia</i>	Fr.	Уссурийск	Уссурийский городской округ	Par	Polyporales	Basidiomycota
MR12	<i>Stereopsis globosa</i>	(Dicks.) Gray	Московская область	Одинцовский район	Le	Polyporales	Basidiomycota

Примечание: Hu — гумусовый сапротроф; Le — сапротроф на древесине (ксилосапротроф); Par — паразит древесных растений; Pin — паразит насекомых; St — подстилочный сапротроф.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Таблицы.

Таблица 20. Средние значения диаметров колоний до и после хранения (на 10 сутки).

№	Видовое название	Средний диаметр колоний, мм												
		К	СП	ДВ	СУБ	"Агаровые блоки"			"Перлитовый протокол"			"Зерновой протокол"		
						Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы														
PR58	<i>A. bisporus</i>	18,9± 0,42	16,4± 0,38	15,8± 0,37	—	2,1± 0,11	3,4± 0,22	2,2± 0,21	4,6± 0,32	9,1± 0,24	—	9± 0,33	22,7± 0,31	19,9± 0,22
RA01	<i>M. alliaceus</i>	23,3± 0,2	19,8± 0,25	23,1± 0,24	н/д	12,2± 0,1	13,2± 0,2	12,4± 0,2	14,3± 0,22	16,6± 0,2	—	14,3± 0,2	17,3± 0,22	16,8± 0,17
RA02	<i>P. impudicus</i>	16,3± 0,12	16,2± 0,12	15,1± 0,15	н/д	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MR61	<i>S. globosum</i>	29,3± 0,12	26,3± 0,12	27,5± 0,15	н/д	17±0,21	16,9± 0,2	17,3± 0,2	22,6± 0,1	23,3± 0,11	22,4± 0,1	22,8± 0,1	25,7± 0,13	24,3± 0,21
Ксилосапротрофы														
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	41,2± 0,05	36,1± 0,04	40,5± 0,04	8,3± 0,02	—	9,4± 0,14	—	9,6± 0,04	14,2± 0,07	—	13,4± 0,07	26,8± 0,05	23,2± 0,09
FE25	<i>A. nigricans</i>	38,8± 0,04	35,6± 0,1	28,7± 0,12	н/д	28,7± 0,12	26,7± 0,1	29,6± 0,12	20,3± 0,05	33,3± 0,08	27,4± 0,1	24,7± 0,1	28,2± 0,11	26,9± 0,1
MR55	<i>F. rossica</i>	49,6± 0,02	48,3± 0,02	49,8± 0,03	21,2± 0,04	30,8± 0,04	31,5± 0,12	39,9± 0,21	46,7± 0,04	46,8± 0,05	47,9± 0,03	28,7± 0,05	25,7± 0,09	28,8± 0,11
MR40	<i>G. lucidum</i>	33,1± 0,1	29,8± 0,13	32,6± 0,15	н/д	32±0,08	23,4± 0,12	20,4± 0,14	32,3± 0,1	26,1± 0,11	36,7± 0,1	31,8± 0,13	26,7± 0,11	26,1± 0,07
MR57	<i>H. coralloides</i>	42,6± 0,5	41±0,16	42,1± 0,18	н/д	25,1± 0,3	26,1± 0,4	19,4± 0,22	38,5± 0,5	37,5± 0,45	—	36,4± 0,43	44,4± 0,32	37,3± 0,4
FE53	<i>H. erinaceus</i>	37,8± 0,13	35,8± 0,12	37,1± 0,2	н/д	21,6± 0,1	19,6± 0,11	14,6± 0,14	29,6± 0,11	20,7± 0,15	16,1± 0,13	20,4± 0,1	32,9± 0,12	30,1± 0,15
RA09	<i>H. flagellum</i>	19,4± 0,18	16,9± 0,1	17,2± 0,12	н/д	—	—	—	—	6,9± 0,11	—	—	—	—
FE20	<i>L. edodes</i>	31,7± 0,2	31,3± 0,2	31,6± 0,19	н/д	17,6± 0,2	22,8± 0,21	22±0,22	—	11,3± 0,21	14,4± 0,2	8,7± 0,21	19,7± 0,17	15,3± 0,14
RA03	<i>L. pyriforme</i>	20,5± 0,22	19,8± 0,12	16,6± 0,18	н/д	13,4± 0,18	15,6± 0,2	16,3± 0,26	—	17,3± 0,13	—	13,3± 0,2	15,4± 0,24	18±0,21
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	49,9± 0,33	48,4± 0,19	49,6± 0,4	н/д	38,7± 0,3	41,1± 0,3	43,9± 0,24	45,6± 0,35	48,4± 0,24	44,7± 0,22	35,6± 0,25	34,5± 0,3	34,1± 0,33
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	48,3± 0,25	48±0,15	47,4± 0,19	н/д	28,3± 0,21	37,6± 0,23	42,2± 0,2	38,2± 0,21	46,7± 0,15	46,4± 0,12	38,6± 0,21	35,6± 0,28	45±0,35
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	41,1± 0,18	36,4± 0,2	37,6± 0,14	н/д	46,4± 0,23	43,1± 0,12	44,4± 0,1	32,2± 0,14	14,2± 0,1	—	42,8± 0,14	40,1± 0,1	41,3± 0,15

MR1	<i>P. ostreatus</i>	50,2± 0,14	47,7± 0,18	50,1± 0,1	20,7± 0,07	47,1± 0,1	47,8± 0,12	48,9± 0,1	49,1± 0,12	49,2± 0,1	49,3± 0,17	49,5± 0,12	49,4± 0,11	49,5± 0,12
Паразиты высших растений														
RA04	<i>F. hepatica</i>	6,7±0,1	6,5± 0,1	6,4±0,1	н/д	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FE30	<i>S. latifolia</i>	4,3± 0,05	4,2± 0,07	4,2± 0,05	н/д	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Паразиты насекомых														
MR67	<i>C. militaris</i>	30,4± 0,22	19,5± 0,2	29,5± 0,18	н/д	–	–	–	11,2± 0,2	10,3± 0,23	12,5± 0,21	7,1± 0,13	8,3± 0,18	9,1±0,2

Примечание: К — контроль, СП — серийные пересевы, ДВ — дистиллированная вода, СУБ — сублимационная сушка, АБ — агаровые блоки, ПП — «перлитовый протокол», ЗП — «зерновой протокол», Г — раствор глицерина (10 %), Т — раствор трегалозы (10 %), ГТ — смесь растворов глицерина и трегалозы (1:1), * — гибель культуры.

Таблица 21. Средние значения ростовых коэффициентов до и после хранения (на 10 сутки).

№	Видовое название	Ростовой коэффициент												
		К	СП	ДВ	СУБ	"Агаровые блоки"			"Перлитовый протокол"			"Зерновой протокол"		
						Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ
Гумусовые сапротрофы														
PR58	<i>A. bisporus</i>	7,56± 0,3	6,56± 0,02	6,32± 0,1	—	0,21± 0,01	0,68± 0,02	0,44± 0,02	0,46± 0,07	3,64± 0,12	—	1,8± 0,02	9,08± 0,12	7,96± 0,1
RA01	<i>M. alliaceus</i>	13,98± 0,6	11,88± 0,5	13,86± 0,45	н/д	2,44± 0,12	5,28± 0,15	4,96± 0,19	2,86± 0,1	6,64± 0,22	—	5,72± 0,07	6,92± 0,09	6,72± 0,11
RA02	<i>P. impudicus</i>	3,26± 0,17	3,24± 0,43	3,02± 0,23	н/д	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MR61	<i>S. globosum</i>	8,79± 0,56	7,89± 0,29	8,25± 0,51	н/д	3,4±0,2	5,07± 0,21	3,46± 0,18	4,52± 0,12	6,99± 0,14	13,44± 0,23	4,56± 0,2	5,14± 0,19	7,29± 0,22
Ксилосапротрофы														
MR16	<i>A. auricula-judae</i>	37,08± 1,07	21,66± 0,55	36,45± 0,87	1,66± 0,01	—	3,76± 0,22	—	3,84± 0,15	8,52± 0,27	—	8,04± 0,32	24,12± 0,41	20,88± 0,45
FE25	<i>A. nigricans</i>	23,28± 0,75	21,36± 0,21	17,22± 0,56	н/д	11,48± 0,23	10,68± 0,25	11,84± 0,11	8,12± 0,3	19,98± 0,37	16,44± 0,21	14,82± 0,21	16,92± 0,29	16,14± 0,37
MR55	<i>F. rossica</i>	44,64± 0,84	43,47± 0,41	44,82± 0,77	8,48± 0,23	18,48± 0,33	28,35± 0,27	35,91± 0,78	42,03± 1,03	42,12± 1,15	43,11± 0,98	17,22± 0,3	15,42± 0,29	25,92± 0,41
MR40	<i>G. lucidum</i>	19,86± 0,43	17,88± 0,37	19,56± 0,21	н/д	19,2± 0,12	9,36± 0,11	8,16± 0,07	19,38± 0,43	5,22± 0,21	14,68± 0,54	19,08± 0,34	16,02± 0,43	15,66± 0,19
MR57	<i>H. coralloides</i>	17,04± 0,51	16,4± 0,42	16,84± 0,34	н/д	5,02± 0,06	10,44± 0,12	3,88± 0,08	15,4± 0,67	15±0,51	—	14,56± 0,14	17,76± 0,25	14,92± 0,17
FE53	<i>H. erinaceus</i>	15,12± 0,72	14,32± 0,38	14,84± 0,56	н/д	8,64± 0,1	7,84± 0,13	5,84± 0,09	11,84± 0,24	8,28± 0,32	6,44± 0,18	8,16± 0,1	13,16± 0,12	12,04± 0,13

RA09	<i>H. flagellum</i>	7,76± 0,2	6,76± 0,33	6,88± 0,31	н/д	–	–	–	–	1,38± 0,09	–	–	–	–
FE20	<i>L. edodes</i>	19,02± 0,43	12,52± 0,25	18,96± 0,27	н/д	10,56± 0,21	9,12± 0,3	13,2± 0,25	–	4,52± 0,2	8,64± 0,41	3,48± 0,03	11,82± 0,08	9,18± 0,08
RA03	<i>L. pyriforme</i>	4,1± 0,16	3,96± 0,12	3,32± 0,1	н/д	1,34± 0,06	3,12± 0,15	3,26± 0,08	–	3,46± 0,14	–	2,66± 0,04	3,08± 0,05	3,6± 0,04
FE34	<i>M. vassiljevae</i>	29,94± 0,71	29,04± 0,54	29,76± 1,1	н/д	23,22± 0,21	24,66± 0,25	26,34± 0,25	27,36± 0,99	29,04± 1,13	26,82± 1,24	21,36± 0,41	20,7± 0,43	20,46± 0,54
FE27	<i>P. citrinopileatus</i>	43,37± 2,73	43,2± 1,1	42,66± 1,43	н/д	11,32± 0,1	33,84± 0,29	37,98± 0,33	34,38± 1,17	42,03± 1,28	41,76± 1,56	23,16± 0,5	32,04± 0,36	40,5± 0,31
PR62	<i>P. nebrodensis</i>	36,99± 2,1	21,84± 1,3	22,6± 2,25	н/д	55,68± 0,56	38,79± 0,55	53,28± 0,42	28,98± 1,03	12,78± 0,94	–	38,52± 0,21	24,06± 0,22	24,78± 0,24
MR1	<i>P. ostreatus</i>	75,3± 3,2	42,93± 2,1	60,12± 2,89	8,28± 0,54	28,26± 0,44	28,68± 0,4	39,12± 0,32	44,19± 1,08	59,04± 1,41	59,16± 1,64	59,4± 1,7	59,28± 1,3	74,25± 1,9
Паразиты высших растений														
RA04	<i>F. hepatica</i>	2,68± 0,02	2,6± 0,05	2,56± 0,08	н/д	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FE30	<i>S. latifolia</i>	1,2± 0,02	1,1± 0,07	0,84± 0,05	н/д	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Паразиты насекомых														
MR67	<i>C. militaris</i>	27,36± 1,47	17,55± 0,61	26,55± 1,23	н/д	–	–	–	6,72± 0,41	6,18± 0,33	11,25± 0,56	6,39± 0,04	7,47± 0,09	8,19± 0,1

Примечание: К — контроль, СП — серийные пересевы, ДВ — дистиллированная вода, СУБ — сублимационная сушка, АБ — агаровые блоки, ПП — «перлитовый протокол», ЗП — «зерновой протокол», Г — раствор глицерина (10 %), Т — раствор трегалозы (10 %), ГТ — смесь растворов глицерина и трегалозы (1:1), * — гибель культуры.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Изменение типа колонии *Pleurotus ostreatus*.

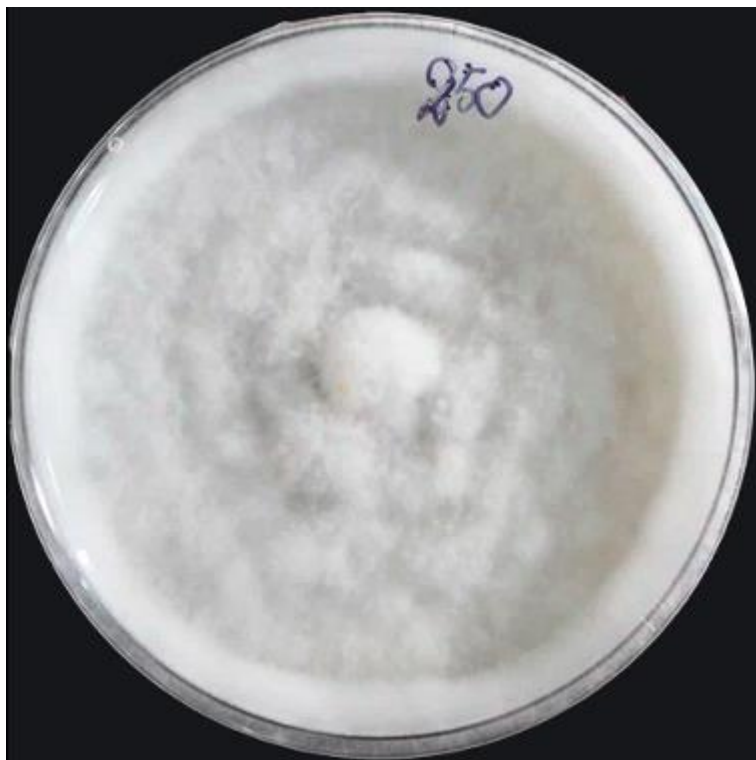


Рис. 29. Колония *Pleurotus ostreatus* до периода хранения (14 сутки). Характерный «войлочный» тип колонии и сильная концентрическая зональность.

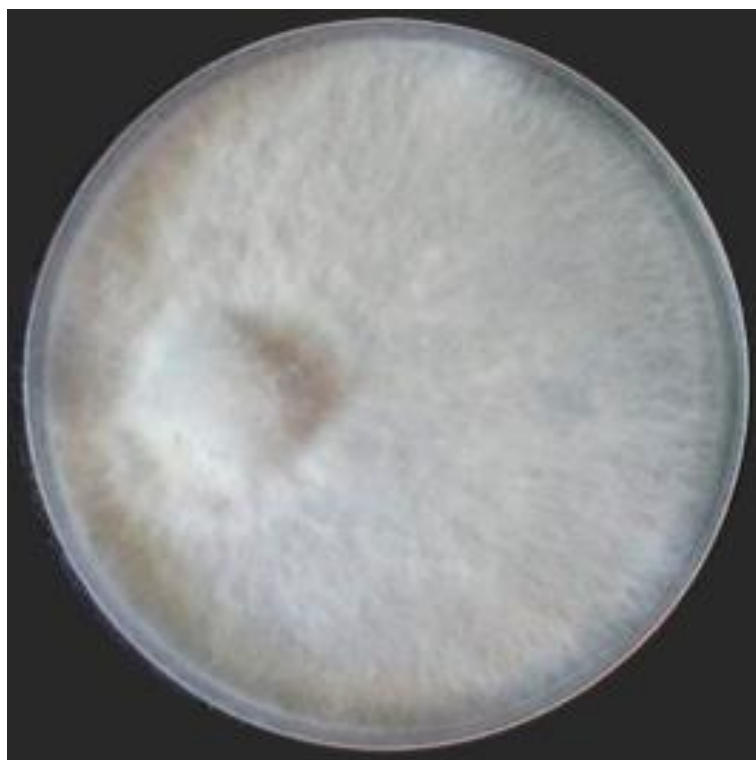


Рис. 30. Колония *Pleurotus ostreatus* после периода хранения методом серийных пересевов (14 сутки). Слабое развитие воздушного мицелия и отсутствие зональности.

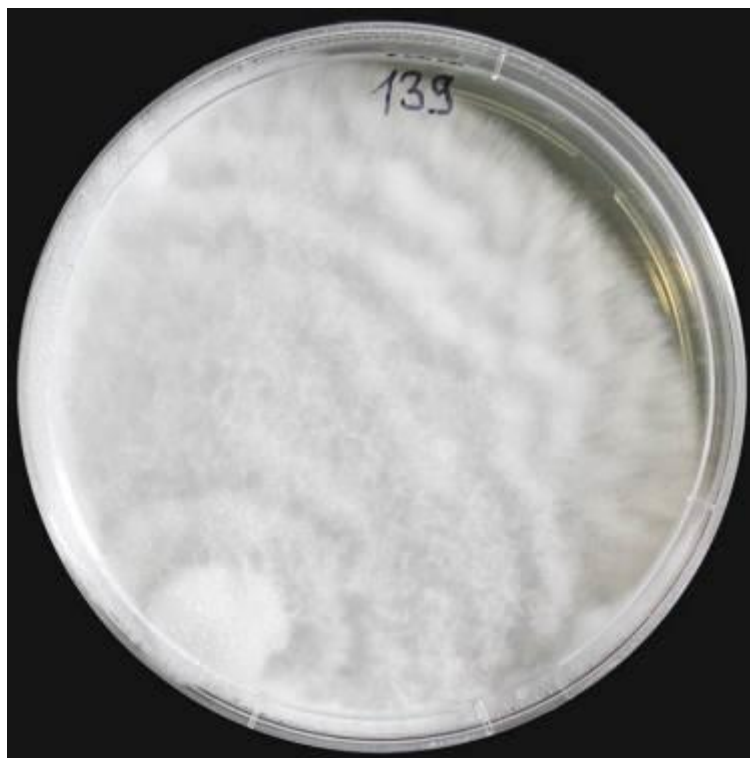


Рис. 31. Колония *Pleurotus ostreatus* после периода хранения под слоем дистиллированной воды (14 суток). Ярко выраженная концентрическая зональность и сильное развитие воздушного мицелия.



Рис. 32. Колония *Pleurotus ostreatus* после периода хранения по методу с использованием агаровых блоков (14 суток). Заметно слабое развитие воздушного мицелия, отсутствие концентрической зональности. Колония менее плотная.



Рис. 33. Колония *Pleurotus ostreatus* после периода хранения по «перлитовому протоколу» (14 сутки). Присутствует концентрическая зональность и более сильное развитие воздушного мицелия.

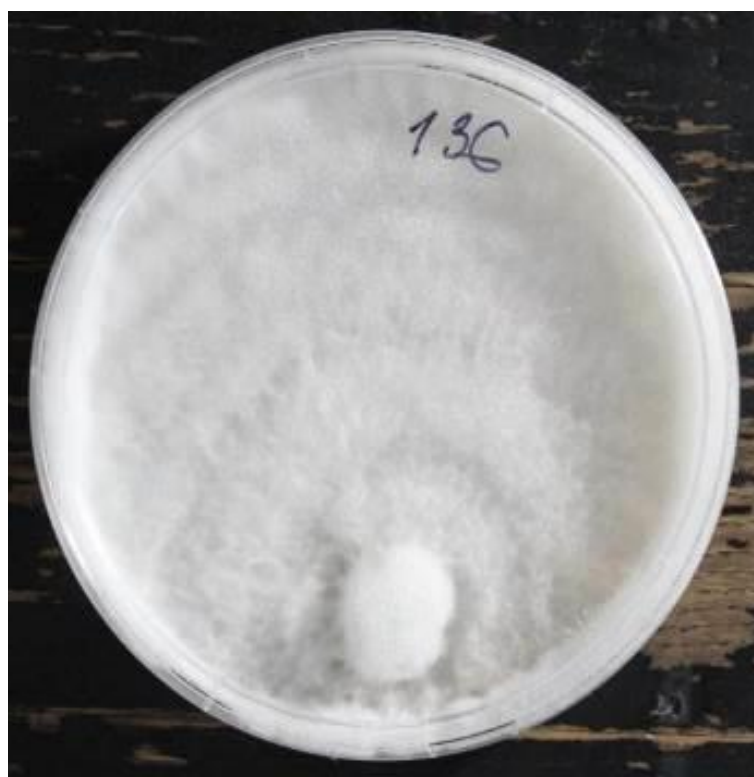


Рис. 34. Колония *Pleurotus ostreatus* после периода хранения по «зерновому протоколу» (14 сутки). Колония с концентрической зональностью и более сильным развитием воздушного мицелия.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Фотографии колоний макромицетов.



Рис. 35. Колония *Auricularia nigricans* после периода криохранения по «перлитовому протоколу» (10 сутки).

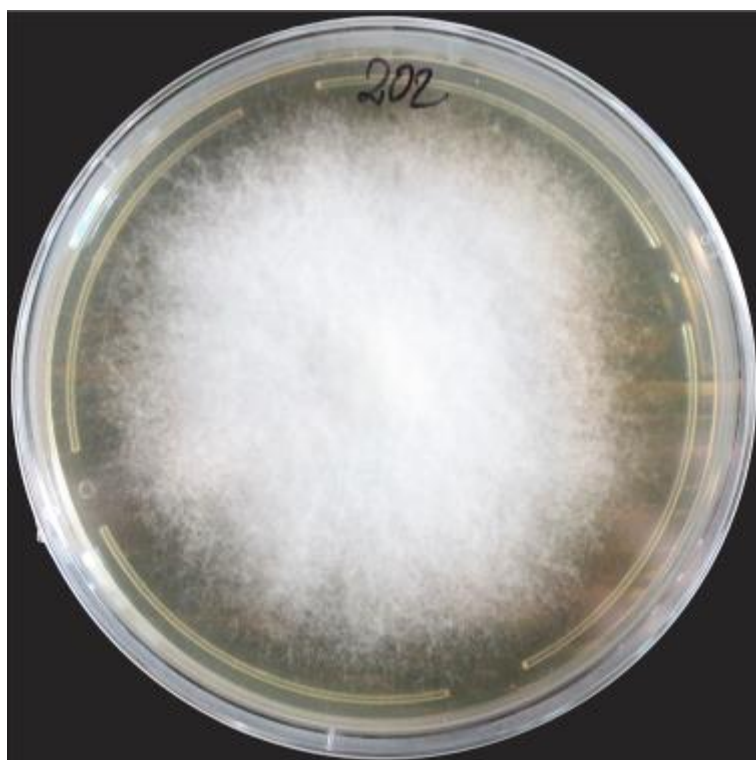


Рис. 36. Колония *Flammulina rossica* после периода криохранения по «зерновому протоколу» (14 сутки).



Рис. 37. Колония *Hericium coralloides* после периода криохранения по «перлитовому протоколу» (14 сутки).

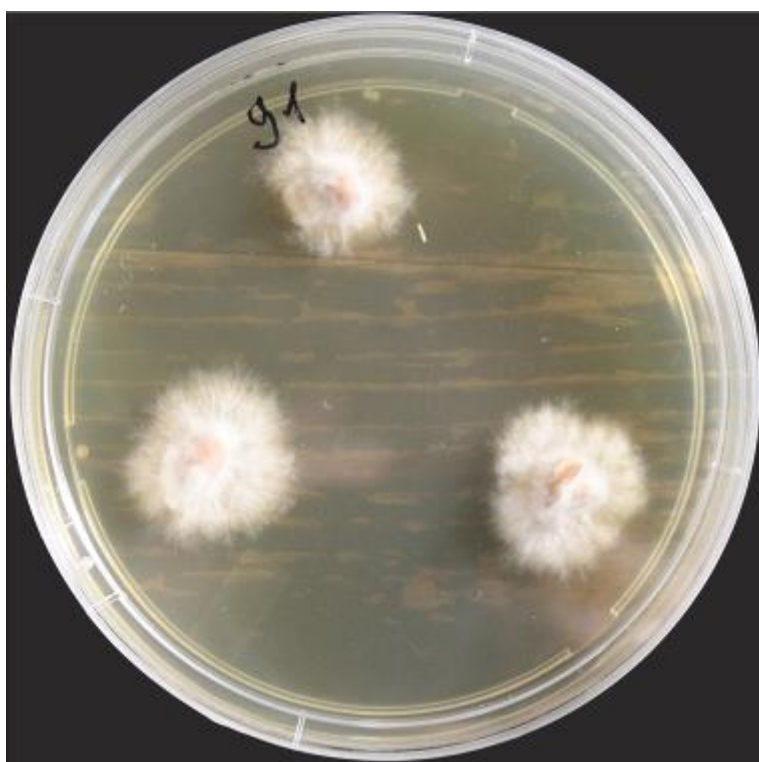


Рис. 38. Колонии *Lycoperdon pyriforme* после периода криохранения по «зерновому протоколу» (10 сутки).



Рис. 39. Колония *Mycetinis alliaceus* после периода криохранения по методу «агаровых блоков» (10 сутки).



Рис. 40. Колония *Pleurotus citrinopileatus* после периода криохранения по «перлитовому протоколу» (14 сутки).