

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

Комиссаров Никита Сергеевич

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ МАКРОМИЦЕТОВ  
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУР

Специальность 1.5.18 Микология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва — 2025

Диссертация подготовлена на кафедре микологии и альгологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научные  
руководители:**

**Гарибова Лидия Васильевна**

Доктор биологических наук, профессор

**Сидорова Ирина Ивановна**

Доктор биологических наук, профессор

**Официальные  
оппоненты:**

**Мухин Виктор Андреевич**

Доктор биологических наук, профессор

ФГБУН «Институт экологии растений и животных УрО РАН», лаборатория биоразнообразия растительного мира и микобиоты, главный научный сотрудник

**Терёшина Вера Михайловна**

Доктор биологических наук

ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, группа экспериментальной микологии, руководитель группы, ведущий научный сотрудник

**Псурцева Надежда Васильевна**

Кандидат биологических наук

ФГБУН «Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН», лаборатория биохимии грибов, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «28» февраля 2025 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

E-mail: [dissovet\\_00155@mail.ru](mailto:dissovet_00155@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале: [dissovet.msu.ru/dissertation/3305](http://dissovet.msu.ru/dissertation/3305)

Автореферат разослан «\_\_» января 2025 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и степень разработанности темы.** 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). Многие виды макромицетов представляют интерес для пищевой и биотехнологической промышленности, поскольку обладают высокой пищевой ценностью и разнообразным биохимическим профилем. Плодовые тела макромицетов являются богатым источником питательных веществ и незаменимых аминокислот (Ahlawat et al., 2016; Vetter, 2019). Макромицеты обладают значительным потенциалом для использования в фармацевтической промышленности, являясь продуцентами различных биоактивных соединений (Liu et al., 2002; Li et al., 2005; Wang et al., 2005; Patel et al., 2012; Deepalakshmi, Sankaran, 2014; Li et al., 2018).

Помимо применения в различных отраслях пищевого и биотехнологического производства, макромицеты представляются перспективными для использования в мероприятиях по биоремедиации экосистем (Deshmukh et al., 2016). Показано, что отдельные виды макромицетов способны 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).

Изучение аспектов физиологии, биохимии и морфологии макромицетов подразумевает наличие рабочих, поддерживаемых в жизнеспособном состоянии, коллекций штаммов 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.). 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 (Hawksworth, 1985; Майорова и др., 2023). Использование макромицетов в хозяйственной деятельности представляет собой уникальный по своей структуре и сложности производственный комплекс, основой которого является поддерживаемая и регулярно обновляемая коллекция штаммов. 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. Используемые методы хранения 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.) (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 хранения 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).

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

Были поставлены следующие **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 эндогликканазную 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 эндоглоканазной 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, эндоглоканазную активность штаммов макромицетов, не способных к формированию покоящихся стадий в культуре. Была выявлена закономерность между принадлежностью к эколого-трофическим группам и способностью штаммов сохранять физиологическую и биохимическую активность после периодов хранения. 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 эндоглоканазной 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 4 всероссийских и международных конференциях и съездах: XVI Международное рабочее совещание по изучению макромицетов (Уссурийск, 2021), 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 7 печатных работ, из которых 5 — статьи в журналах, индексируемых РИНЦ, SCOPUS и Web of Science, и 2 — тезисы и материалы конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на \_\_\_ страницах, содержит разнообразный иллюстративный материал — таблицы, фотографии, графики, имеет обширное приложение. Список использованных источников включает 259 работ (24 отечественных и 235 зарубежных источников).

**Благодарности.** Выражаю искреннюю благодарность моим научным руководителям и наставникам, д.б.н. проф. Гарибовой Лидии Васильевне и д.б.н. Сидоровой Ирине Ивановне за 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, Борисову Борису Александровичу за штамм *Cordyceps militaris*, д.б.н. в.н.с. кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Александровой Алине Витальевне за ценные комментарии и помощь, 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 и членам моей семьи и моим близким за их неоценимую поддержку и терпение.

# СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

## Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведены данные об основных методах хранения чистых культур макромицетов, достоинствах и недостатках общепринятых в микологических исследованиях и модифицированных протоколов хранения, классификации криопротекторных соединений и механизме их действия. Обобщены данные о механизме возникновения криотравм и негативных факторах длительного хранения чистых культур. Рассмотрены данные об использовании нестандартных субстрат-носителей мицелия с целью повышения вероятности сохранения жизнеспособности культур.

## Глава 2. Материалы и методы исследования

**Места сбора образцов.** Проведён анализ материалов, собранных в ходе экспедиций и полевых выездов в период с 2019 по 2023 год. Сбор плодовых тел (спорокарпов) осуществляли на территории г. Москвы и Московской области, в Приморском крае (на территории Уссурийского заповедника ДВО РАН и сопредельных территориях), в Республике Адыгея (на территории Кавказского государственного природного биосферного заповедника им. Х.Г. Шапошникова и сопредельных территориях) и в г. Минск, Республика Беларусь. Сбор спорокарпов осуществляли маршрутным методом. Перед сбором плодовые тела фотографировали, фиксировали координаты точки сбора при помощи GPS-навигатора Garmin eTrex 10. Проводили описание и фотографирование места сбора и субстрата.

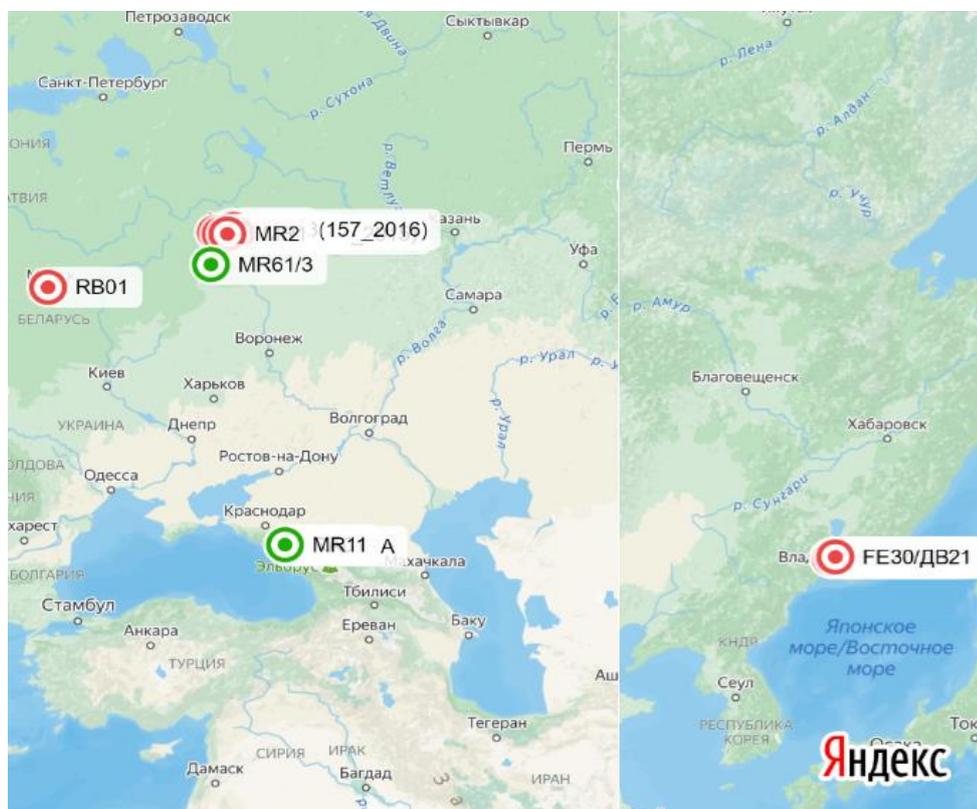


Рис. 1. Места сбора плодовых тел макромицетов.

Прим. красными метками обозначены места сбора ксилосапротрофных макромицетов, зелёными — места сбора гумусовых и подстилочных сапротрофов.

**Изоляция чистых культур.** Изоляцию проводили тканевым методом, помещая фрагменты трамы на следующие агаризованные среды: сусло-агар (4 градуса по Баллингу) (Пидопличко, 1953) и среда № 337 по стандарту American Type Culture Collection. Данные питательные среды были выбраны как наиболее универсальные для выделения макромицетов разных таксономических и эколого-трофических групп. Для подавления бактериального роста в питательные среды вносили антибиотики цефтриаксон или цефотаксим из расчета 0,75 мг/мл питательной среды.

**Базовая коллекция штаммов.** В результате работы по сбору и выделению чистых культур была сформирована базовая коллекция, которая включала 74 штамма 43 видов 30 родов макромицетов. Из них 40 видов принадлежат к отделу Basidiomycota, 3 — к отделу Ascomycota (рис. 2, 3).

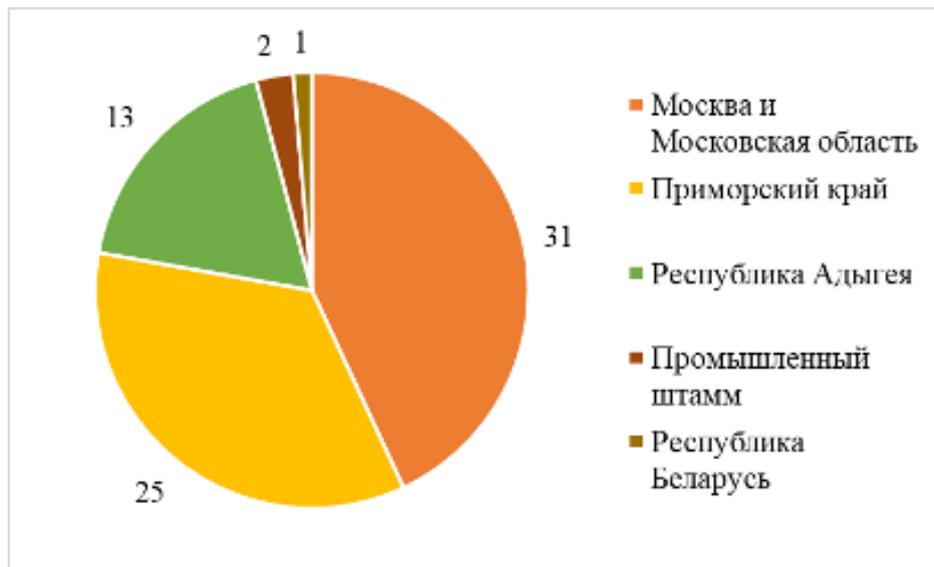


Рис. 2. Географическая принадлежность штаммов чистых культур базовой коллекции.

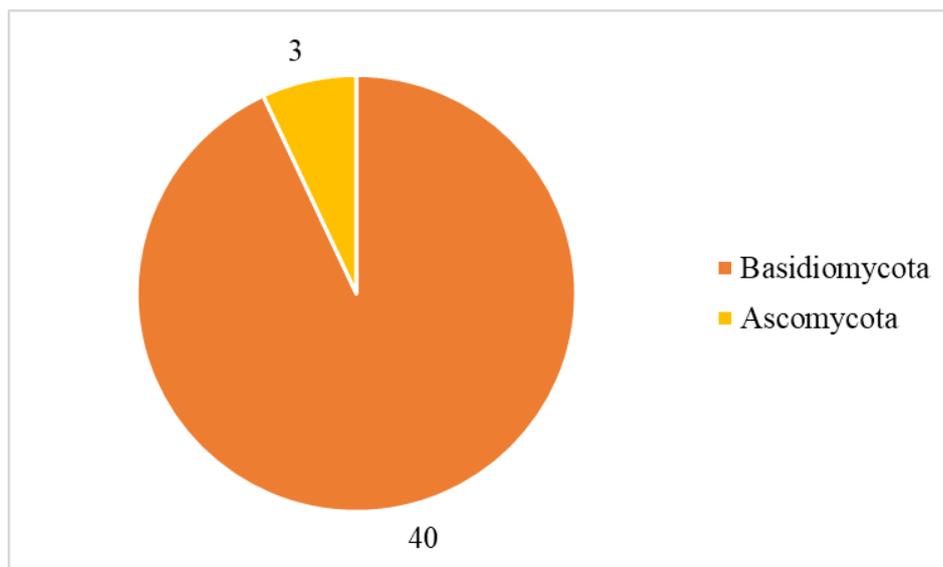


Рис. 3. Таксономическая принадлежность выделенных штаммов чистых культур макромицетов.

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. 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 — подстилочных сапротрофа. Среди остальных 9 штаммов, 8 — относят к группе паразитов древесных растений и 1 штамм паразитов насекомых (рис. 4, 5).

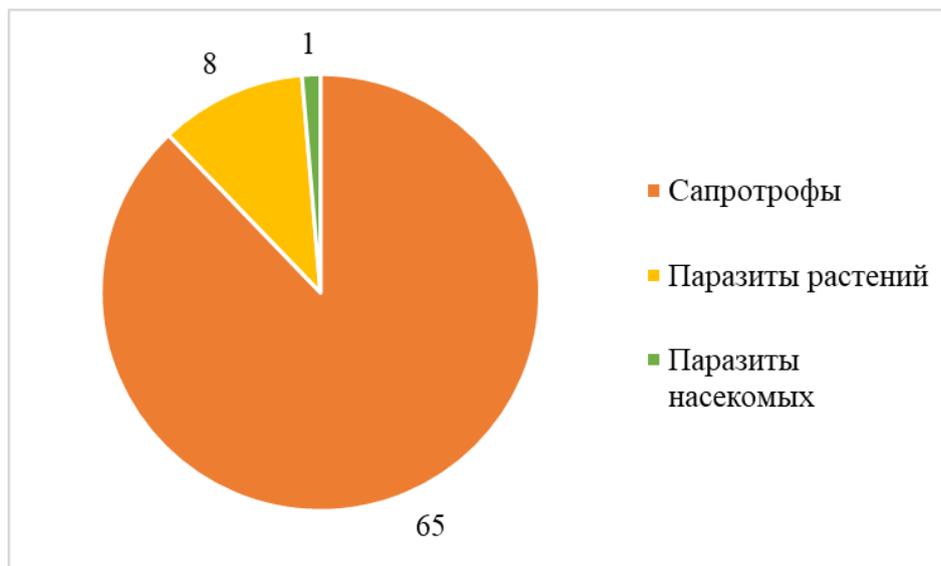


Рис. 4. Эколого-трофические группы штаммов чистых культур, входящих в состав базовой коллекции.

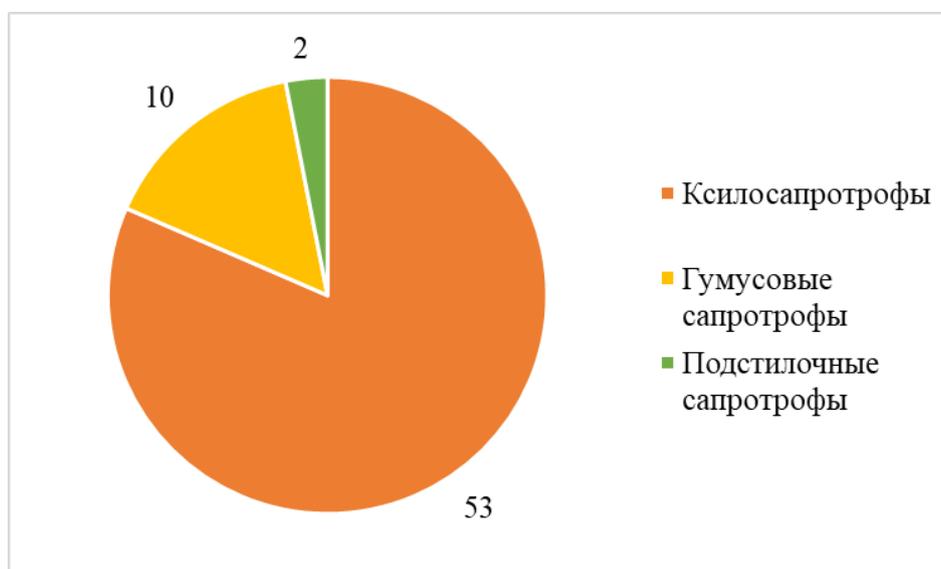


Рис. 5. Число штаммов базовой коллекции чистых культур (по подгруппам сапротрофной эколого-трофической группы).

**Рабочая коллекция штаммов.** Для дальнейшего изучения были отобраны 20 штаммов (табл. 1). Целью было отобрать штаммы видов, относящихся к разным таксономическим и эколого-трофическим группам, многие из которых нашли прикладное применение как в пищевой, так и фармацевтической промышленности.

Таблица 1. Рабочая коллекция штаммов чистых культур макромицетов.

Штамм	Вид	Субстрат	Охранный статус
<b>Гумусовые сапротрофы (Hu)</b>			
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
<b>Ксилосапротрофы (Le)</b>			
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>Mycoleptonoides 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
<b>Паразиты древесных растений (Par)</b>			
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
<b>Паразиты насекомых (Pin)</b>			
MR67	<i>Cordyceps militaris</i> (L.) Fr.	Личинка мухи	7 региональных Красных книг

Примечание: MR — Московская область, FE — Приморский край, PR — промышленный штамм, RA — Республика Адыгея; \* — видовая принадлежность подтверждена молекулярно-генетическими методами.

**Морфологическая идентификация.** Видовую идентификацию осуществляли по морфологии и микроскопии плодовых тел. Для определения видовой принадлежности использовали общепринятые определители, ревизии 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.

**Молекулярно-генетическая идентификация.** 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.

**Методы хранения штаммов.** После определения видовой принадлежности изолятам макромицетов присваивали индивидуальные номера и вносили в электронную базу данных. Также, данные о штаммах включали в состав коллекции кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, зарегистрированной в электронной базе данных World Data Centre for Microorganisms. Из собранных плодовых тел изготавливали ваучерные гербарные образцы для передачи в состав гербария Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН, Санкт-Петербург).

Полученные штаммы помещали на хранение следующими методами:

1. Хранение методом серийных пересевов (субкультивирование);
2. Хранение под слоем дистиллированной воды;
3. Хранение в сублимированном состоянии;
4. Хранение в замороженном состоянии (криохраниление):
  - 4.1 Хранение на «агаровых блоках» (Hwang, 1960);
  - 4.2 Хранение по «перлитовому протоколу» (Homolka et al., 2001);
  - 4.3 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. Период хранения составил 8 месяцев.

**Морфолого-культуральные характеристики штаммов.** После изъятия штаммов с хранения проводили посев на агаризованную среду и инкубацию при температуре +25 °С в течение 14 суток. Анализ морфолого-культуральных характеристик проводили до и после периода хранения штаммов на 10 сутки инкубирования при +25 °С на агаризованной среде №337. Фиксировали морфолого-культуральные характеристики — тип колонии (войлочная, ватообразная, бархатистая и т.д.), окраски аверса и реверса колонии, наличие или отсутствие экссудата, концентрической зональности, тяжёлой, характер края колонии, наличие секторов (Stalpers, 1978; Бухало, 1988). Анализ микроморфологии включал в себя подсчёт количества пряжек на длину гифы при увеличении  $\times 1000$  (увеличение объектива —  $\times 100$ ; увеличение окуляра —  $\times 10$ ) (Камзолкина, Богданов, 2017). Изучение микроморфологических характеристик проводили с использованием микроскопа Leica DM500.

**Физиологические характеристики штаммов.** Проводили измерение диаметров колоний и ростового коэффициента как показателей физиологической активности культуры. После посева на питательную среду с вторых суток инкубации, каждые 24 часа, проводили замеры диаметров колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях (Burnett, 1976). Для измерения ростового коэффициента проводили замеры высоты воздушного мицелия и плотности колонии (по трёхбалльной шкале) (Бухало, 1988).

**Эндоглюканазная активность штаммов.** Для измерения эндоглюканазной активности штаммов применяли динитросалициловый метод — метод расчёта по восстанавливающим сахарам, образующимся в результате ферментативной реакции (Синицын и др., 1995). Использовали модификацию данного метода с использованием карбоксиметилцеллюлозы в качестве субстрата, что позволило значительно ускорить протекание реакции (Антропова и др., 2015). Штаммы макромицетов выращивали на жидких средах Гетчинсона с микрокристаллической целлюлозой в качестве источника углеродного питания. Колбы со средой инокулировали изъятими с хранения культурами и инкубировали на лабораторном шейкере в течение 7 суток (для быстрорастущих штаммов) и 14 суток (для медленно растущих). Спектрофотометрическое исследование проводили при помощи спектрофотометра В-1100 («ЭКОВЬЮ», КНР).

**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 эндогликаназной активности. Статистическую обработку данных проводили в пакете программ Statistica 12.0. Осуществляли однофакторный дисперсионный анализ с тестированием выборки на гомогенность (тест Левена) и нормальность распределения. Проводили апостериорный анализ данных по методу Ньюмена-Кейлса и по методу Тьюки (уровень вероятности  $P = 0,95$ ) (Newman, 1939; Tukey, 1949; Keuls, 1952).

### Глава 3. Результаты и обсуждение

**Жизнеспособность штаммов после хранения.** Все отобранные штаммы сохранили свою жизнеспособность в процессе хранения на агаризованных средах как методом серийных пересевов, так и под слоем дистиллированной воды (табл. 2). Применение методов сублимации показало, что макромицеты способны, при соблюдении ряда условий, переживать хранение в высушенном состоянии.

Таблица 2. Сохранение жизнеспособности культур макромицетов после хранения.

№	Вид	Жизнеспособность											
		СП	ДВ	С У Б	АБ			ПП			ЗП		
					Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ	Г	Т	ГТ
<b>Гумусовые сапротрофы</b>													
PR58	<i>A. bisporus</i>	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+++ <sup>1</sup>	++
RA01	<i>M. alliaceus</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	–	+	+	+
RA02	<i>P. impudicus</i>	+	+	н/д	–	–	–	–	–	–	–	–	–
MR61	<i>S. globosum</i>	+	+	н/д	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Ксилосапротрофы</b>													
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>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Паразиты древесных растений</b>													
RA04	<i>F. hepatica</i>	+	+	н/д	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FE30	<i>S. latifolia</i>	+	+	н/д	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>Паразиты насекомых</b>													
MR67	<i>C. militaris</i>	+	+	н/д	–	–	–	+	+	+	+	+	+

Примечание: К — контроль, СП — серийные пересевы, ДВ — дистиллированная вода, СУБ — сублимационная сушка, АБ — агаровые блоки, ПП — «перлитовый протокол», ЗП — «зерновой протокол». Г — 10 % раствор глицерина, Т — 10 % раствор трегалозы, Г+Т — смесь 10 % растворов глицерина и трегалозы. <sup>1</sup> — увеличение диаметра колонии после изъятия с хранения.

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.

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. 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).

**Морфолого-культуральные и физиологические характеристики штаммов.** Среди отобранных штаммов были отмечены следующие типы колоний (по Stalpers, 1978): войлочный (felty), перистый (plumose), плёночный или субвойлочный (pellicular or subfelty), хлопковый (cottony), шерстистый (woolly). Изменение типа колонии после изъятия с хранения наблюдали только у *Pleurotus ostreatus*.

Метод серийных пересевов. Отмечали слабое развитие воздушного мицелия. Фиксировали уменьшение количества пряжек или их полную утрату (табл. 3). Тип колонии и края колоний для большинства штаммов оставался неизменным. Для всех штаммов наблюдали замедление роста колоний по сравнению с контрольными значениями (табл. 4). Вместе с этим, было отмечено, что границы лаг-фазы сдвигались по сравнению с контролем на 1 — 2 суток. Подобные изменения могут быть связаны с использованием неоптимальных питательных сред и постепенным старением культур. Необходимо учитывать, что контрольные значения скорости роста были получены для свежесделанных чистых культур. Снижение значений ростового коэффициента так же было отмечено (табл. 4). При этом, замедление роста колоний гумусовых сапротрофов, в среднем, было более слабым по сравнению с ксилосапротрофами.

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, снижение скорости роста и вирулентности для фитопатогенных и энтомопатогенных видов. (Samšínáková, Kalalova, 1983; Number, 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 виды, 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; Коваленко, 2022; Псурцева, Кияшко, 2022).

Таблица 3. Среднее количество мицелиальных прядек на длине гифы 500 мкм, после периода хранения согласно выбранным протоколам (увеличение  $\times 1000$ ).

№	Вид	Среднее число мицелиальных прядек						
		К	СП	ДВ	СУБ	АБ	ПП	ЗП
<b>Гумусовые сапротрофы</b>								
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	–	–	–
<b>Ксилосапротрофы</b>								
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
<b>Паразиты высших растений</b>								
RA04	<i>F. hepatica</i>	3	3	3	н/д	–	–	–
FE30	<i>S. latifolia</i>	7	6	8	н/д	–	–	–

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

Метод хранения под слоем дистиллированной воды. Как и в случае с предыдущим методом, все изученные штаммы сохранили свою жизнеспособность при хранении под слоем дистиллированной воды. В то же время, было отмечено замедление роста ряда штаммов, что может быть связано с продолжительным воздействием низких температур и нахождением в микроаэробных условиях (табл. 4). Использование этого метода позволяет увеличить срок хранения и избежать частых пересевов на новые питательные среды, что в значительной степени снижает 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 (Burdsall, 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).

Хранение в сублимированном состоянии. Среди штаммов, помещённых на хранение в сублимированном состоянии (*A. bisporus*, *A. auricula-judae*, *F. rossica*, *P. ostreatus*), вакуумную сушку 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. Для колоний *P. ostreatus* было показано развитие колоний по шерстистому (woolly) типу, в отличие от войлочного типа, характерного для контроля. Фиксировали значительное падение числа пружек (*F. rossica*) или их полную утрату (*P. ostreatus*) (табл. 3).

Криохраниение. Метод «агаровых блоков». После 8-месячного хранения исследуемых штаммов по данному протоколу, было отмечено сильное замедление роста колоний и снижение ростовых коэффициентов ( $> 1$  мм/сут). Штаммы видов *Cordyceps militaris*, *Fistulina hepatica*, *Hericium flagellum*, *Phallus impudicus*, *Sparassis latifolia* не смогли сохранить свою жизнеспособность ни в одном из вариантов криохраниения. В то же время, культуры штаммов *Auricularia auricula-judae*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, утратили свою жизнеспособность только в отдельных вариантах опыта по криохраниению.

Большинство исследуемых штаммов, хранившихся согласно данному протоколу, продемонстрировали более активное развитие стелющегося по поверхности субстрата мицелия, т.н. поисковых гиф. Усиленное развитие поисковых гиф может свидетельствовать о том, что при воздействии стрессовых условий, штамм стремится быстрее освоить субстрат. Воздушный мицелий формировался сравнительно слабо, и колонии были менее плотными.

10 % раствор глицерина был наиболее эффективен для штаммов видов *Auricularia nigricans*, *Hericium erinaceus* и наименее — для включённых в рабочую коллекцию штаммов видов гумусовых сапротрофов.

10 % раствор трегалозы был оптимальным криопротектором для штаммов гумусовых сапротрофов. В то же время, культура штамма *Auricularia auricula-judae* смогла выжить только в данном варианте эксперимента, вместе с сильным замедлением роста колоний и уменьшением ростового коэффициента.

В варианте криохраниения с использованием смеси криопротекторов большинство ксилосапротрофных видов показывали более высокие значения скорости роста и ростового коэффициента, по сравнению с другими вариантами. Использование смеси криопротекторов негативно сказывалось на характеристиках культур видов гумусовых и подстилочных сапротрофов.

Протокол с использованием агаровых блоков нашел широкое применения 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).

Таблица 4. Средние значения диаметров колоний до и после периода хранения (на 10 сутки).

№	Вид	Средний диаметр колоний, мм						
		К	СП	ДВ	СУБ	АБ	ПП	ЗП
<b>Гумусовые сапротрофы</b>								
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
<b>Ксилосапротрофы</b>								
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± 0,33	48,4± 0,19	49,6± 0,4	н/д	43,9± 0,33	48,4± 0,19	35,6± 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	–	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
<b>Паразиты древесных растений</b>								
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	–	–	–
<b>Паразиты насекомых</b>								
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». \* — после «±» приведены значения стандартной ошибки среднего.

Криохраниение. «Перлитовый протокол». После 8 месяцев хранения по «перлитовому протоколу» для большинства штаммов наблюдали значительное снижение значений средней скорости роста и ростового коэффициента колоний, что можно объяснить стрессовым фактором длительного хранения в замороженном состоянии. Тем не менее, падение скорости роста было не таким сильным как в случае протокола с использованием «агаровых блоков». Была выделена группа штаммов (*Flammulina rossica*, *Mycoleptodonoides vassiljevae*, *Pleurotus ostreatus*), демонстрировавшая более сильное развитие поисковых гиф при более слабом развитии воздушного мицелия. В то же время, штаммы видов *Ganoderma lucidum* и *Lycoperdon pyriforme*, наоборот, увеличивали скорость роста и ростового коэффициента, что может быть связано с использованием мицелием гриба излишков трегалозы и глицерина как дополнительных источников питания, а также индивидуальными характеристиками штамма.

Как и в предыдущем методе, 10 % раствор глицерина показал худшие результаты, за исключением штаммов видов *Hericium coralloides*, *H. erinaceus*, *Pleurotus ostreatus*. 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.

10 % раствор трегалозы оставался наиболее подходящим для штаммов гумусовых сапротрофов. Смесь криопротекторов, в свою очередь, показала хорошие результаты в сохранении морфолого-культуральных и физиологических характеристик штаммов ксилосапротрофных видов. Паразиты древесных пород не смогли сохранить свою жизнеспособность ни в одном из вариантов криохраниения.

Криохраниение. «Зерновой протокол». Отмечено, что отдельные штаммы демонстрируют увеличение скорости роста по сравнению с контрольными значениями. 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 формирует больше поисковых гиф.

«Зерновой протокол» показал наиболее высокую эффективность по сравнению с другими протоколами криохраниения, позволив сохранить, а ряде случаев и увеличить скорость роста культур и количество пряжек на длину гифы. Большинство почвенных сапротрофов, замороженных по «зерновому протоколу», показали наилучшие 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. При этом, использование 10 % раствор глицерина, хоть и позволял сохранять жизнеспособность исследуемых штаммов, но приводило к значительному снижению числа пряжек.

Исходя из полученных данных можно утверждать, что для изученных 20 штаммов макромицетов оптимальными были метод хранения под слоем дистиллированной воды, а также «перлитовый» и «зерновой» протоколы криохранения (табл. 4). 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.

**Эндоглюканазная активность штаммов.** Было отмечено, что штаммы, относящиеся к различным эколого-трофическим группам, обладают различающимися уровнями эндоглюканазной активности (рис. 6). Так, штаммы видов гумусовых сапротрофов показали сравнительно низкую активность эндоглюканаз, в пределах значений от 0,098 до 0,297 единиц, что связано с их особенностями питания. 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 гумусный сапротроф, напротив, демонстрировал сравнительно более высокие значения активности эндоглюканаз — от 0,392 до 0,93 единиц.

Ксилосапротрофные виды продемонстрировали высокую активность эндоглюканаз в более широких границах — от 0,09 до 1,132 единиц. Как и для гумусовых сапротрофов, оптимальными были метод хранения под слоем дистиллированной воды и метод криохранения по «зерновому протоколу» в варианте с использованием 10 % раствора трегалозы и смеси КПС. Высокие значения активности были зарегистрированы и для культур, хранившихся по «перлитовому протоколу». Худшие результаты были показаны для культур, претерпевавших хранение методом серийных пересевов и методом «агаровых блоков».

Культуры *Fistulina hepatica* (RA04) и *Sparassis latifolia* (FE30), относящихся к группе паразитов высших растений, продемонстрировали низкие значения активности эндоглюканаз, что связано с особенностями питания данных видов. Штамм паразита насекомых *Cordyceps militaris* (MR67) также показал низкие значения эндоглюканазной активности, при этом, наиболее высокую активность регистрировали для культур, помещённых на хранение по «зерновому протоколу».

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. Во вторую группу были включены штаммы, для которых отмечали резкие изменения значений эндоглюканазной активности. К первой группе относили 15 штаммов макромицетов. Ко второй — штаммы *Hericium coralloides* (MR57), *H. erinaceus* (FE53), *Lentinula edodes* (FE20), *Pleurotus citrinopileatus* (FE27), *Sarcosoma globosum* (MR61). Подобные различия можно объяснить индивидуальными

особенностями штаммов. Целесообразным является расширение спектра исследуемых штаммов и изучение экзогликоканазной и гликозидазной активности.

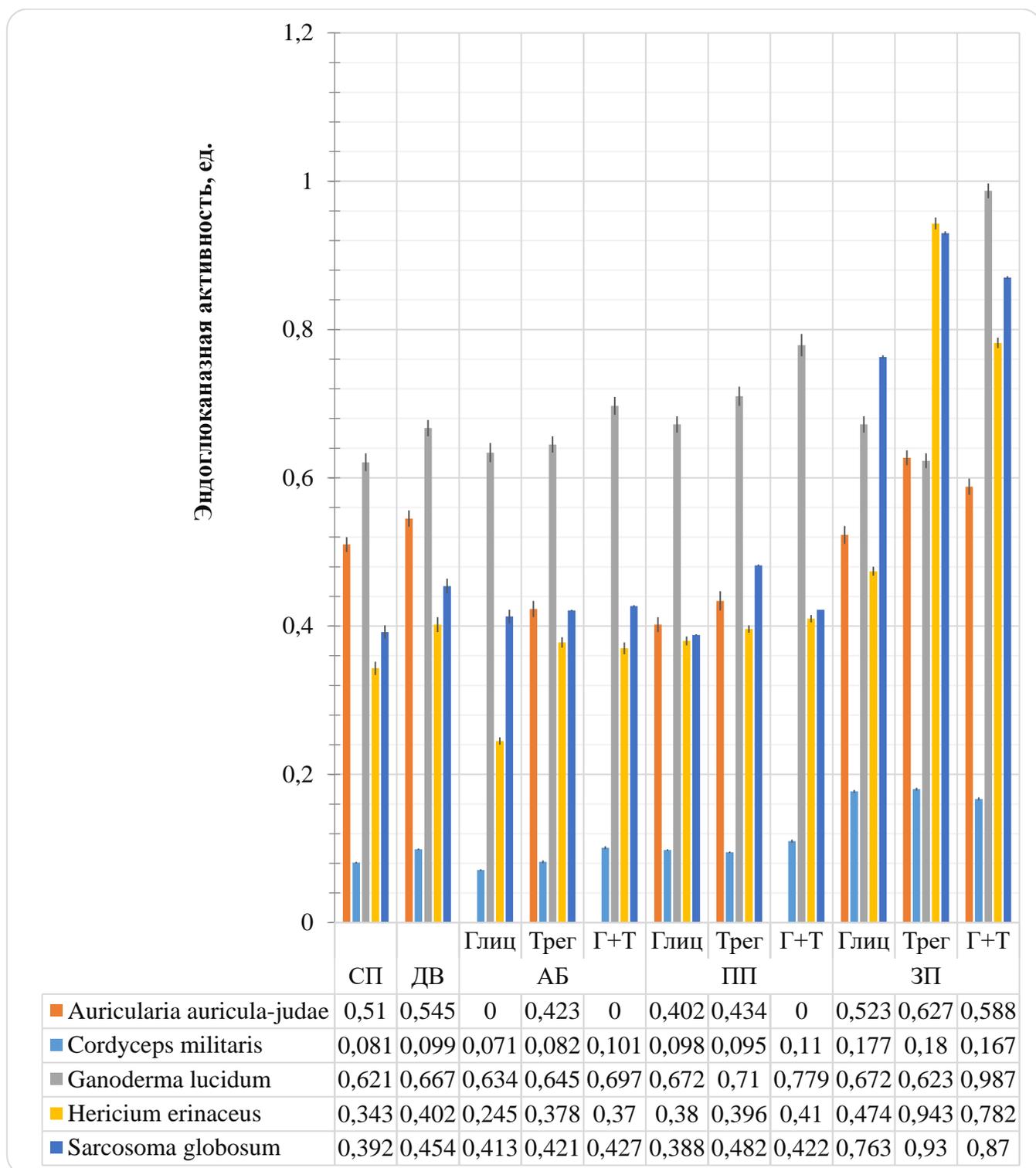


Рис. 6. Эндогликоканазная активность штаммов макромицетов.

Высокую активность эндогликоканаз у культур, хранившихся по «зерновому протоколу», можно объяснить тем, что, как было показано выше, зерновой мицелий лучше сохраняет свои ростовые характеристики. 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. Вместе с этим, использование перлита также позволяет сохранять целлюлозолитическую активность на достаточно высоком уровне, что может быть связано с тем, что перлит, обладающий пористой структурой, может защищать мицелий от резкого выброса скрытой тепловой энергии, который возникает в момент заморозки биоматериала (Tan et al., 2021).

Изменения в активности эндоглюканаз в зависимости от выбранного метода хранения, предположительно, связаны с индивидуальными характеристиками штамма. Тем не менее, отметим, что, по имеющимся данным, 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.

## 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 эндоглюканазной 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 эндоглюканазной 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, 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 культур 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 пружек, 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.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова

1. **Комиссаров Н. С.**, Дьяков М. Ю., Гарибова Л. В. Методы длительного хранения чистых культур макромицетов // Микология и фитопатология. 2023. Т. 57, № 3. С. 155–171. <http://doi.org/10.31857/S0026364823030054>. [Scopus, Q4, SJR=0,216, SNIP=0,430, импакт-фактор РИНЦ: 1,114] 2,125/1,95 (здесь далее приведён объем публикации в печатных листах и вклад автора).
2. **Комиссаров Н. С.**, Дьяков М. Ю., Гарибова Л. В. Хранение чистых культур редких видов макромицетов в связи с перспективами реинтродукции и транслокации // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. 2024. Т. 129, № 2. С. 54–66. <http://doi.org/10.55959/MSU0027-1403-BB-2024-129-2-54-66>. [RSCI, РИНЦ (eLibrary Science Index), импакт-фактор РИНЦ: 0,359] 1,625/1,55.
3. **Комиссаров Н. С.**, Дьяков М. Ю., Гарибова Л. В. Влияние методов хранения на жизнеспособность и скорость роста макромицетов // Микология и фитопатология. 2024. Т. 58, № 4. С. 314–326. [Scopus, Q4, SJR=0,216, SNIP=0,431, импакт-фактор РИНЦ: 1,114] 1,625/1,57.
4. **Komissarov N. S.**, Dyakov M. Yu., Garibova L. V. Influence of Storage Methods on the Vitality and Growth Rate of Macrofungi // Doklady Biological Sciences. 2024. V. 519. P. 387–396. [doi.org/10.1134/S0012496624701278](http://doi.org/10.1134/S0012496624701278). [Scopus, Q3, SJR=0,22, SNIP=0,58] 1,25/1,21.
5. **Komissarov N. S.**, Dyakov M. Yu., Garibova L. V. Methods for Long-Term Storage of Pure Macromycete Cultures // Biology Bulletin Reviews. 2024. V. 14 (1). P. 1–16. <http://doi.org/10.1134/S2079086424600796>. [Scopus, RSCI, Q4, SJR=0,13, импакт-фактор РИНЦ: 1,304] 2,000/1,92.