

А.С. ЧИБИЗОВА, Е.Н. БАРСУКОВА, Г.В. ГУКОВ

## Поверхностное культивирование мицелия гриба шиитаке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) на питательных средах с биостимуляторами

Важным звеном при разработке эффективных технологий искусственного выращивания ценных и редких грибов, таких как шиитаке, является изучение биологических особенностей и производственных показателей мицелиальной культуры *in vitro*. В работе приведены результаты применения стимуляторов роста при поверхностном культивировании мицелия природного изолята шиитаке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler), выделенного из естественного места обитания (Уссурийский район). Установлено стимулирующее влияние препаратов Гумат+7, Эпин-экстра, Циркон на культуру *L. edodes* при добавлении их в питательную агаризованную овсяную среду. Определены концентрации биостимуляторов, способствующих увеличению показателей роста и качества мицелиальных колоний – Гумат+7 (50 мг/л), Эпин-экстра (0,5 и 0,1 мл/л) и Циркон (0,5 мл/л).

**Ключевые слова:** искусственное выращивание, *Lentinula edodes*, мицелий, *in vitro*, биостимулятор, скорость роста, ростовой коэффициент.

**Surface cultivation of mycelium of shiitake mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) on nutrient media with biostimulants.** A.S. CHIBIZOVA, E.N. BARSUKOVA (Federal Scientific Center of Agrobiotechnology in the Far East named after A.K. Chaika, Ussuriysk, Timiryazevsky village), G.V. GUKOV (Primorskaya State Academy of Agriculture, Ussuriysk, Timiryazevsky village).

*Biological characteristics and production parameters of mycelial culture in vitro is an important link in the development of effective technologies of artificial cultivation of valuable and rare mushrooms, such as shiitake. The paper presents the results of the practical application of growth stimulants during the surface cultivation of the mycelium of the natural isolate of Shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler), isolated from its natural habitat (Ussuriysk Region). The stimulating effect of the preparations Humate+7, Epin-extra, and Zircon on the culture of *L. edodes* when they are added to the agarized oat nutrient has been established. The concentrations of biostimulants that contribute to the increase in the growth rate and quality of mycelial colonies were determined: Humate+7 (50 mg/l), Epin-extra (0.5 and 0.1 ml/l), and Zircon (0.5 ml/l).*

**Key words:** artificial cultivation, *Lentinula edodes*, mycelium, *in vitro*, biostimulant, growth rate, growth coefficient.

### Введение

Ксилотрофные базидиомицеты занимают важное место в структуре растительных и лесных биоценозов. Дереворазрушающий гриб шиитаке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) является одним из наиболее перспективных объектов для изучения и дальнейшего использования, поскольку отличается большой пищевой ценностью, вкусовыми качествами плодовых тел и наличием уникального комплекса биологически активных веществ [2].

\*ЧИБИЗОВА Алена Сергеевна – младший научный сотрудник, БАРСУКОВА Елена Николаевна – кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующего лабораторией (Федеральный научный центр агроботехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Уссурийск, пос. Тимирязевский), ГУКОВ Геннадий Викторович – доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры лесоводства (Приморская государственная сельскохозяйственная академия, Уссурийск). \*E-mail: chibizova1991@bk.ru

Тысячелетиями он использовался восточными лекарями как средство, наделяющее энергией и продлевающее жизнь. Благодаря уникальным целебным и питательным свойствам шиитакэ называли не иначе как «императорский гриб» или «король грибов».

Шиитакэ – традиционный гриб в восточных и азиатских странах. Он выращивается в горных районах Японии, Китая, Кореи и Дальнего Востока России. Излюбленным местом его обитания является мертвый ствол дерева шиа, из которого гриб получает основное питание. Собственно, благодаря этому гриб и получил свое название: по-японски «шиа» – вид каштанового дерева, а «такэ» – гриб [9]. В Приморском крае шиитакэ растет в широколиственных лесах с преобладанием дуба монгольского, преимущественно на мертвой древесине дуба. Грибы развиваются на пнях, отрубках, порубочных остатках (ветвях) самых различных диаметров. Гриб был найден на п-ове Муравьев-Амурский, в Лазовском, Уссурийском, Партизанском, Шкотовском и Хасанском районах [7]. Маршрутное обследование лесных территорий края, проведенное П.А. Коминым в 2016 г., показало, что шиитакэ также встречается в Спасском, Чугуевском, Дальнегорском, Красноармейском, Кавалеровском, Тернейском, Черниговском, Пожарском, Дальнереченском районах [6].

Н.Г. Розломий и Г.В. Гуков отмечают, что в Приморском крае шиитакэ развивается в основном на полуразложившейся древесине дуба монгольского, т.е. на валеже, порубочных остатках, не сгоревших в результате лесных пожаров остатках крупной древесины и т.д. [8]. По данным авторов, урожайность шиитакэ в природных условиях и при экстенсивном выращивании (искусственном посеве в отрезки древесины длиной 1 м) напрямую зависит от сложившихся климатических условий. Метод интенсивного искусственного выращивания шиитакэ имеет ряд преимуществ. Он позволяет получать плодовые тела в более короткие сроки, регулировать и контролировать процесс плодоношения, создавая необходимые для этого условия, а также подбирать оптимальные составы субстрата и мицелиальные штаммы для культивирования [5, 11].

Шиитакэ относится к реликтовым грибам. Он занесен в Красную книгу Приморского края, поэтому сбор, употребление и продажа его плодовых тел запрещены [1]. В связи с этим приоритетные задачи биотехнологических исследований – разработка эффективных технологий искусственного выращивания шиитакэ, а также изучение биологических особенностей его перспективных штаммов и продукционных показателей интенсивности роста в культуре *in vitro*.

Цель настоящей работы – оценка влияния биостимуляторов (Циркон, Эпин-экстра, Гумат+7) на интенсивность роста мицелиальной культуры природного изолята гриба шиитакэ при поверхностном культивировании *in vitro*.

## Материалы и методика исследований

Объектом исследования служила мицелиальная культура шиитакэ (*L. edodes*), выделенная из плодовых тел, собранных на древесных остатках дуба монгольского в естественных местообитаниях (с. Каменушка Уссурийского района), а также стимуляторы роста – Циркон, Эпин-экстра и Гумат+7.

Выращивание мицелия шиитакэ осуществляли в чашках Петри (диаметром 10 см) методом поверхностного культивирования при температуре  $22 \pm 2$  °С до полного зарастания питательной среды мицелием. Опыт включал в себя 10 вариантов, контролем служила овсяная агаризованная среда (ОА), состоящая из 60 г овсяной муки, 20 г сахарозы, 20 г агара на 1 л дистиллированной воды. Другие варианты опыта включали различные концентрации биостимуляторов, добавленных в овсяную среду (табл. 1).

Питательную среду стерилизовали автоклавированием при давлении 0,11 МПа в течение 20 мин. Посев культуры гриба осуществляли в строго асептических условиях ламинар-бокса. Инокуляционный блок размером 1,5 см переносили на питательную среду. Эксперимент проводили в пяти биологических повторностях. Для установления влияния

биологически активных компонентов на рост и развитие мицелиальных колоний шиитаке определяли скорость линейного роста и ростовой коэффициент (РК) по методу А.С. Бухало [3]:

$$PK = d \times h \times g/t,$$

где  $d$  – диаметр колонии, мм;  $h$  – высота колонии, мм;  $g$  – плотность колонии, баллы;  $t$  – возраст колонии, сут.

Вычисление скорости линейного роста колонии проводили по формуле

$$V = (D - d) / t,$$

где  $D$  – диаметр колонии, мм;  $d$  – диаметр инокуляционного блока, мм;  $t$  – продолжительность культивирования, сут.

Плотность колонии отмечалась по трехбалльной системе: 1 – редкая, 2 – средняя, 3 – плотная.

Статистическую обработку данных интенсивности роста колоний проводили на 7-е, 14-е и 21-е сутки, различия между вариантами опыта оценивали с помощью средней арифметической ( $\bar{x}$ ), ошибки средней арифметической ( $S\bar{x}$ ), критерия Стьюдента ( $t$ ) и коэффициента вариации ( $V$ , %) [4].

## Результаты и обсуждение

Активный рост мицелиальных колоний шиитаке наблюдался через семь суток культивирования на всех вариантах агаризованных питательных сред (рис. 1, а).

Размер колоний мицелия составлял в среднем 39,5 мм, максимальный диаметр наблюдался на контрольной среде – 43,8 мм (табл. 2).

Значения показателя «диаметр колонии» между вариантами характеризовались низким варьированием, существенных отличий не отмечено. В биологических повторностях ( $n = 5$ ) диаметр колоний шиитаке варьировал в зависимости от стимулятора роста и его концентрации. Изменчивость данного показателя была минимальной при культивировании на

Варианты опыта

№ п/п	Состав питательной среды	Концентрация стимулятора роста в 1 л среды
1	ОА + Циркон	0,1 мл
2	ОА + Циркон	0,25 мл
3	ОА + Циркон	0,5 мл
4	ОА + Эпин-экстра	0,5 мл
5	ОА + Эпин-экстра	0,1 мл
6	ОА + Эпин-экстра	0,15 мл
7	ОА + Гумат +7	50 мг
8	ОА + Гумат+7	100 мг
9	ОА + Гумат+7	150 мг
10	Контроль – овсяная агаризованная среда (ОА)	0

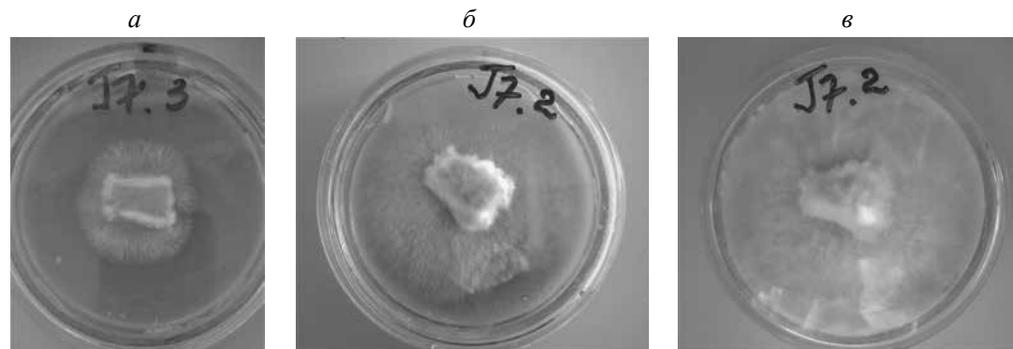


Рис. 1. Рост мицелиальных колоний *L. edodes* на среде со стимулятором роста Гумат+7: а – на 7-е, б – на 14-е, в – на 21-е сутки

Динамика роста мицелия гриба шиитаке на овсяной агаризованной среде с добавлением биостимуляторов

Вариант опыта	Стимулятор, концентрация, мг/л	Диаметр колонии, мм						t <sub>факт</sub>
		7-е сутки		14-е сутки		21-е сутки		
		$\bar{x} \pm S\bar{x}$	V, %	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	V, %	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	V, %	
1	Циркон, 0,1	40,0 ± 0,7	4,0	73,6 ± 1,2	3,7	85,4 ± 2,7	7,15	0,46
2	Циркон, 0,25	40,2 ± 3,6	16,9	70,4 ± 4,7	15,0	85,8 ± 2,1	5,55	0,70
3	Циркон, 0,5	40,0 ± 3,1	9,8	70,6 ± 4,3	13,5	84,2 ± 3,5	9,32	0,05
4	Эпин-экстра, 0,5	34,0 ± 2,4	15,7	70,8 ± 2,3	7,2	86,2 ± 1,4	3,61	1,15
5	Эпин-экстра, 0,1	41,6 ± 1,9	10,4	76,4 ± 2,3	6,8	85,6 ± 1,2	3,15	1,19
6	Эпин-экстра, 0,15	37,2 ± 1,9	11,8	69,4 ± 4,4	14,1	81,4 ± 1,3	3,64	0
7	Гумат+7, 50	39,0 ± 4,4	25,4	75,0 ± 1,8	5,5	90,4 ± 1,2*	2,98	3,44*
8	Гумат+7, 100	36,8 ± 3,5	21,3	69,6 ± 5,4	17,4	80,8 ± 5,6	15,41	0
9	Гумат+7, 150	42,6 ± 4,8	25,3	71,2 ± 5,3	16,7	84,0 ± 2,3	6,24	0
10	Контроль, без стимулятора	43,8 ± 3,6	18,4	74,4 ± 5,9	8,0	84,0 ± 1,4	3,76	0
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	39,5 ± 0,9	7,4	72,1 ± 0,8	3,4	84,8 ± 0,8	3,2	

\* P ≤ 0,05; t<sub>теор</sub> = 2,3; n = 5.

овсяной среде с добавлением Циркона в концентрации 0,1 и 0,5 мг/л (V = 4,0 %, V = 9,8 % соответственно) и максимальной в вариантах 7, 9 с добавлением 50 и 150 мг/л среды Гумата+7 (V = 25,4 %, V = 25,3 % соответственно). При дальнейшем культивировании на 14-е и 21-е сутки произошло значительное снижение варьирования роста колоний (на 21-е сутки средний по опыту коэффициент вариации составил 3,2 %). Максимальный диаметр мицелиальной колонии отмечен при добавлении в овсяную питательную среду 50 мг/л препарата Гумат+7 (рис. 1, б, в). Данный стимулятор роста также положительно повлиял на линейную скорость роста мицелия, на 21-е сутки ее значение было максимальным в опыте – 10,8 мм/сут (рис. 2).

Препарат Гумат+7 характеризуется комплексным органоминеральным составом, в который наряду с гуминовыми кислотами, содержащими аминокислоты, полисахариды, витамины, гормоноподобные и другие вещества, также входят семь биофильных микроэлементов (Fe – 0,4 %, Cu – 0,2 %, Zn – 0,2 %, Mn – 0,17 %, Mo – 0,018 %, Co – 0,02 %, B –

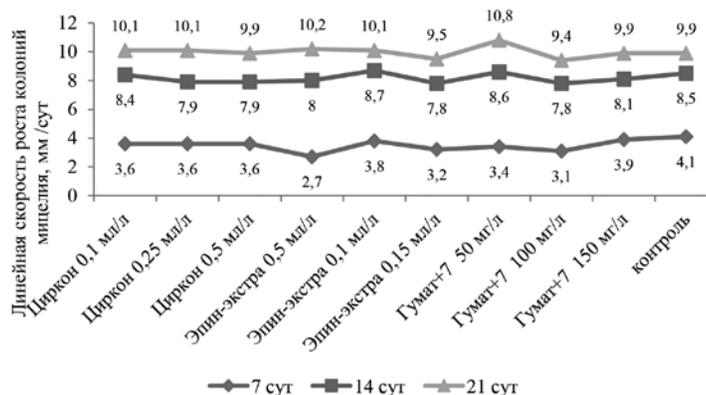


Рис. 2. Линейная скорость роста *L. edodes* в зависимости от содержания стимулятора роста в овсяной среде

0,2 %), а также калий, азот, магний и сера. Применение препарата Гумат+7 на растениях активизирует синтез белков и углеводов, что способствует повышению интенсивности процессов дыхания, фотосинтеза и водообмена, улучшает рост корневой системы<sup>1</sup>. В условиях искусственного культивирования шиитаке относится к медленнорастущим грибам по сравнению с вешенкой (*Pleurotus ostreatus*), поэтому поиск биорегуляторов, ускоряющих его рост и развитие, очень важен. В нашем эксперименте препарат повлиял на ускорение роста мицелия *L. edodes*. Наряду с препаратом Гумат+7 стимулирующий эффект на рост культуры шиитаке оказал Эпин-экстра в концентрации 0,5 мл/л, под его влиянием размер колоний на 21-е сутки составил 86,2 мм, линейная скорость роста – 10,2 мм/сут (табл. 1, рис. 2).

Использование в эксперименте ростового коэффициента позволяет получить более полную характеристику колонии мицелия, культивируемой на агаризованной питательной среде, так как при его вычислении учитываются не только количественные показатели (диаметр колонии, диаметр инокуляционного блока, продолжительность культивирования, высота колонии), но и качественный показатель – плотность колонии. Такой комплексный подход помогает дать более объективную оценку. На рис. 3 графически представлены ростовые коэффициенты на контрольной среде с добавлением различных концентраций биостимуляторов. Наибольшее значение ростового коэффициента на 21-е сутки культивирования мицелия шиитаке отмечено в вариантах с использованием стимуляторов Эпин-экстра в концентрации 0,5 и 0,1 мл/л (ростовой коэффициент 110,8 и 110,1 соответственно), а также Циркон (0,5 мл/л), Гумат+7 (100 мг/л), ростовые коэффициенты соответственно 108,2 и 103,9, на контрольной овсяной среде – 72 (рис. 3).

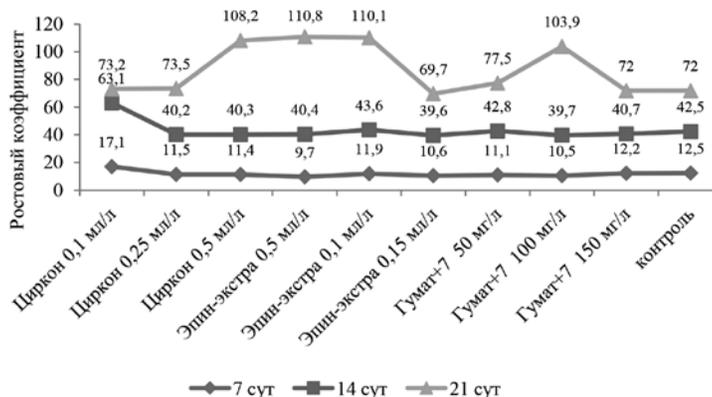


Рис. 3. Ростовой коэффициент мицелиальных колоний *L. edodes* в зависимости от содержания стимулятора роста в овсяной среде

Визуально можно сравнить колонии мицелия по плотности при культивировании со стимуляторами Эпин-экстра (рис. 4), Циркон и Гумат+7 (рис. 1). Культура мицелия шиитаке на среде с 0,5 и 0,1 мл/л Эпин-экстра и 0,5 мл/л Циркон была плотной (3 балла по трехбалльной шкале), на среде с 50 мг/л Гумат+7 – средней по плотности (2 балла).

О положительном действии Эпина на рост мицелиальной культуры *L. edodes* сообщается в работе Р.В. Усачевой [10]. По ее данным, внесение в питательную среду Эпина ( $10^{-7}$  мг/мл) увеличило скорость роста мицелия в 1,5 раза. Эффективность регулятора роста Эпин-экстра подтверждена при его использовании на вешенке [9] и шампиньоне<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Бегзи В.В. О свойствах Гумата +7 и его применении. – <https://rosselhoccenter.com/index.php/otdel-semenovodstva-41/17522-o-svoystvakh-gumata-7-i-ego-primenenii> (дата обращения: 13.01.2021).

<sup>2</sup> Применение регуляторов роста и микроудобрений при выращивании грибов. – <https://nest-m.ru/blog/entry/ovoshchnye-primenenie-regulyatorov-rosta-i-mikroudobrenij-pri-vyrashchivanii-gribov.html> (дата обращения: 15.01.2021).

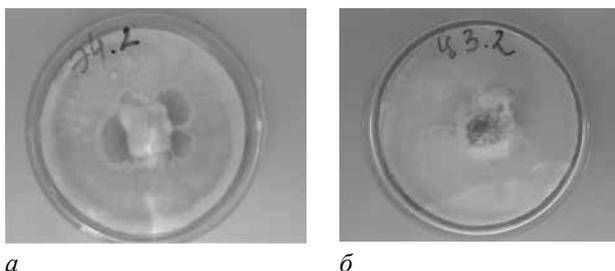


Рис. 4. Мицелиальные колонии *L. edodes* на 21-е сутки культивирования на средах с биостимуляторами: а – на среде с 0,5 мл/л Эпин-экстра, б – с 0,5 мл/л Циркона

Установлено также стимулирующее действие Циркона на развитие грибницы шампиньона [8]. Публикаций о применении Циркона и Гумата+7 на культуру гриба шиитаке нами не найдено. В связи с этим полученные экспериментальные данные представляют научный интерес при разработке технологии ускоренного развития и повышения продуктивности шиитаке в условиях искусственного культивирования.

### Заключение

При поверхностном культивировании мицелиальных колоний природного изолята шиитаке *L. edodes* на агаризованной овсяной среде с добавлением биостимуляторов выявлено стимулирующее действие на процессы роста колоний препарата Гумат+7 в концентрации 50 мг/л, на 21-е сутки роста диаметр колоний был максимальным в опыте –  $90,4 \pm 1,20$  мм (в контроле  $84,0 \pm 1,42$  мм). Препараты Эпин-экстра (0,5 и 0,1 мл/л) и Циркон (0,5 мл/л) оказали положительное действие на качество колоний мицелия, что проявилось в увеличении плотности культуры и максимальных значениях ростового коэффициента (110,8; 110,1; 108,2 соответственно).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Булах Е.М., Говорова О.К. Грибы. Базидиомицеты // Красная книга Приморского края: Растения. Владивосток, 2008. С. 584–651.
2. Булах Е.М. Грибы – источник жизненной силы. Владивосток: Русский остров, 2001. 64 с.
3. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наук. думка, 1988. 144 с.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований): стереотип. изд. М.: Альянс, 2014. 351 с.
5. Комин П.А. Ареал гриба шиитаке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) в Приморском крае // Вестн. КрасГАУ. 2017. № 4. С. 178–181.
6. Комин П.А. Искусственное выращивание гриба шиитаке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) на хвойных опилках // Вестн. КрасГАУ. 2016. № 11. С. 15–19.
7. Комин П.А. Особенности биологии гриба шиитаке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) на территории лесного участка ПГСХА «Реликт Приморья» // Вестн. КрасГАУ. 2016. № 6. С. 27–31.
8. Розломий Н.Г., Гуков Г.В. Опыт искусственного выращивания грибов шиитаке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) в условиях юга Дальнего Востока как один из способов повышения рекреационной привлекательности лесов // Изв. Самар. НЦ РАН. 2017. Т. 19, № 2 (3). С. 536–539.
9. Усачева Р.В., Евдокимова О.А., Польских С.В., Аксеновская В.Е. Влияние эписпориолида на рост и развитие мицелия *Pleurotus ostreatus* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36, № 4. С. 44–46.
10. Усачева Р.В. Физиолого-биохимические особенности некоторых штаммов культивируемого гриба *Lentinula edodes*. (Berk. Sing.): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Воронеж, 2003. 25 с.
11. Хуссейн А.С., Налбандян А.А. Оптимизация процесса культивирования грибов шиитаке в искусственно созданных условиях // Вестн. Россельхозакадемии. 2012. № 2. С. 31–32.