

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им.
М. В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

Кафедра микологии и альгологии

Долгосрочная криоконсервация макромицетов

Выпускная квалификационная работа бакалавра
студентки IV курса
Арзамасцевой Виктории Олеговны

Научный руководитель
канд. биол. наук
Воронко Оксана Васильевна

Москва
2019

- Макромицеты — несистематическая группа грибов с макроскопическими плодовыми телами («грибы» в бытовом понимании).
- Большая часть культивируемых макромицетов – это базидиальные грибы (отдел Basidiomycota), которые в лабораторных условиях существуют в форме неспорулирующих мицелиальных культур.
- Коллекции живых культур — это источник живого стабильного материала для экспериментальной науки, биотехнологии, для пищевой и фармацевтической промышленности.

Криоконсервация

- Основной способ длительного хранения неспорулирующих культур.
- Хранение при температуре $-70-86^{\circ}\text{C}$ или в жидком азоте ($-150-196^{\circ}\text{C}$).
- Криохраниение — травматичная процедура для живых организмов.
- Для защиты хранимых организмов от криоповреждений используются вещества-криопротекторы.

Криопротекторы для макромицетов

Группа	Криопротектор	Число упоминаний
Спирты	Глицерин	34
	Этиленгликоль	2
	Полиэтиленгликоль	3
Сульфоксиды	ДМСО (Диметилсульфоксид)	5
Моно- и олигосахариды	Глюкоза	2
	Лактоза	1
	Сахароза	5
Полимеры	Сепарированное молоко	2
	Солодовый экстракт	2
Смеси	Глицерол + трегалоза	1
	ДМСО/сорбитол	1
	Сахарозо-желатиновый агар	1
	без криопротектора	4

Цель и задачи

Цель работы – определить оптимальные концентрации глицерина для криохранения мицелия макромицетов в рамках оптимизации кафедрального протокола.

Задачи эксперимента:

1. Проследить влияние концентрации глицерина на жизнеспособность культур после замораживания.
2. Проследить особенности реакции разных штаммов на замораживание-оттаивание.

13 штаммов из коллекции культур
Культивирование (СА 150/1, 25°C)

Схема эксперимента

Заморозка (медленная) по
модифицированному кафедральному
протоколу в водных растворах
криопротекторов:

- 1) Вода (контроль)
- 2) Глицерин (5%, 10%, 20%, 30%, 50%)
- 3) Сахара (глюкоза 5%, сахароза 10%, ксилоза 5%)

Хранение при -85°C

2 недели хранения

6 недель хранения

12 недель хранения

Разморозка, высев на среду,
культивирование 25°C

Измерение колоний
Фиксация морфологических изменений
Микроскопия

Штаммы

Ксилотроф на мертвой древесине	Ксилотроф на живой древесине	Подстилочный сапротроф

Коллекционный номер	название
MSU FM 0060	<i>Ganoderma cf. lucidum</i> (Curtis) P. Karst.
MSU FM 0063	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quél.
MSU FM 0067	<i>Phaeolus schweinitzii</i> (Fr.) Pat.
MSU FM 0072	<i>Panellus serotinus</i> (Pers.) Kühner
MSU FM 0076	<i>Pholiota squarrosoides</i> (Peck) Sacc.
MSU FM 0078	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (Jacq.) P. Karst.
MSU FM 0090	<i>Flammula alnicola</i> (Fr.) P. Kumm.
MSU FM 0097	<i>Crucibulum</i> sp.
MSU FM 0103	<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.) Gray
MSU FM 0157	<i>Pholiota aurivella</i> (Batsch) P. Kumm.
MSU FM 0211	<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.) Pers.
MSU FM 0212	<i>Mycetinis scorodonius</i> (Fr.) A.W. Wilson & Desjardin
MSU FM 0214	<i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) With.



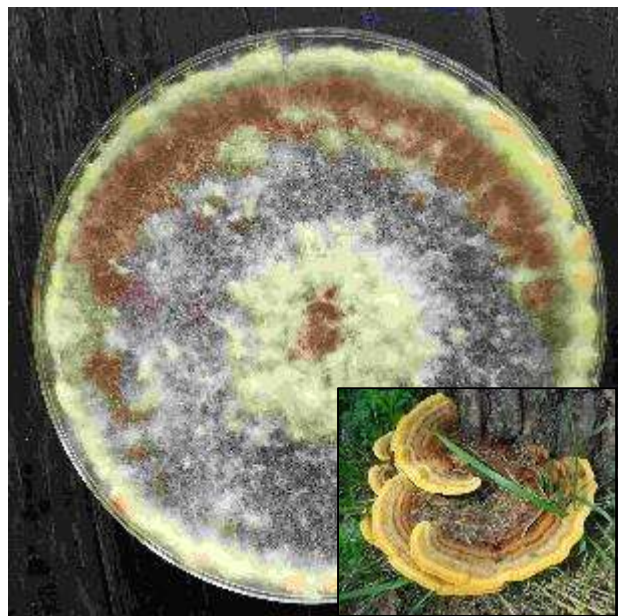
Pholiota aurivella



Fistulina hepatica



Ganoderma lucidum



Phaeolus schweinitzii



Mycetinis scorodonius



Panellus serotinus

Концентрация криопротектора (глицерин)

0%

5%

10%

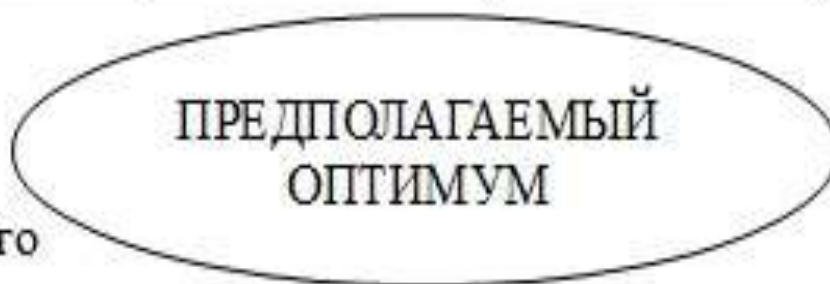
20%

30%

50%



Усиление протекторного
эффекта
Повышение вязкости
растворителя



Ослабление ингибирующего
эффекта проникающего
криопротектора



Время
хранения

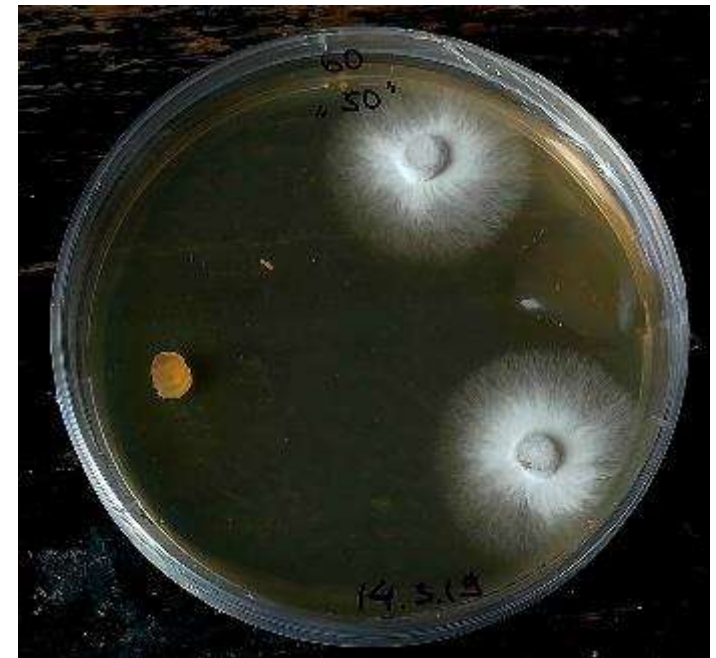
Оценка жизнеспособности неспорулирующих культур:

1. Выживаемость — рост мицелия от агарового блока (единицы хранения).
2. Латентный период — интервал от момента высева до видимого роста.
3. Динамика роста — измерение растущих колоний
4. Морфологические изменения

Результаты: выживаемость

Все опытные штаммы подтвердили жизнеспособность.

Небольшая доля смертности наблюдалась у *Pleurotus pulmonarius*, *Flammula alnicola*, *Ganoderma lucidum* при использовании 50% глицерина.



Ganoderma lucidum

Число жизнеспособных блоков

	протектор	вода	Глицерин					глюкоза	сахароза	ксилоза
	концентрация		5%	10%	20%	30%	50%	5%	10%	5%
штамм	название									
MGU FM 0060	<i>Ganoderma cf. lucidum</i>	14/14	14/14	13/14	14/14	14/14	13/14	3/6	6/6	2/6
MGU FM 0063	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	9/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0067	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0072	<i>Panellus serotinus</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0076	<i>Pholiota squarrosoides</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0078	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0090	<i>Flammula alnicola</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	11/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0097	<i>Crucibulum sp.</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0103	<i>Grifola frondosa</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0157	<i>Pholiota aurivella</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0211	<i>Hericium erinaceus</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0212	<i>Mycetinis scorodonius</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0214	<i>Fistulina hepatica</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	5/6	6/6	6/6

Результаты: латентный период

- После разморозки культуры некоторое время не показывают видимого роста.
- Минимальная длительность — менее суток (*Crucibulum* sp.), максимальная — 17 суток (*Phaeolus schweinitzii*).
- Усредненная длительность латентного периода — 3-5 суток.

Усредненное время начала роста для разных штаммов по всем концентрациям (%)

Сутки после высева

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Ganoderma cf. lucidum</i>			10, 20	0, 5, 30, 50					
<i>Pleurotus pulmonarius</i>		0, 5	10, 20	30	50				
<i>Phaeolus schweinitzii</i>							20	10, 30, 50	0, 5
<i>Panellus serotinus</i>			0 - 30	50					
<i>Pholiota squarrosoides</i>			20	0-10, 30-50					
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>			0 - 50						
<i>Flammula alnicola</i>			0 -10	20		30			50
<i>Crucibulum sp.</i>		0 - 10	20 - 50						
<i>Grifola frondosa</i>			0	5	10 и 30	20	50		
<i>Pholiota aurivella</i>			0 - 50						
<i>Hericium erinaceus</i>				0 - 10	20	30	50		
<i>Mycetinis scorodonius</i>			0 - 30			50			
<i>Fistulina hepatica</i>			0 - 30	50					



→ Начало вегетативного роста мицелия

Результаты: мицелиальный рост

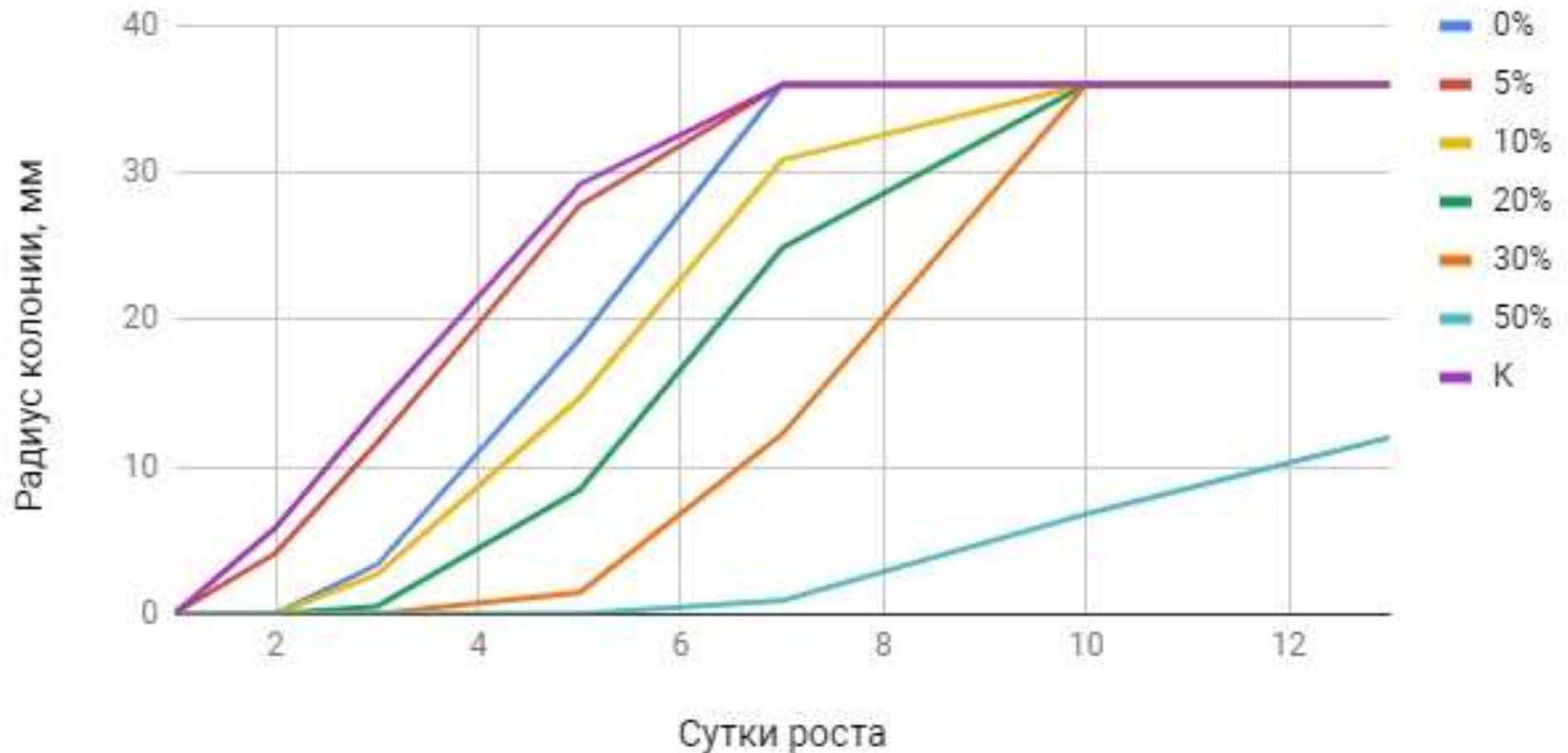
Группа 1 MAX: 0-10%. MIN: 20-50%.	Группа 2 MAX: 10-30% MIN: 0-5% и 50%	Группа 3 Нет различий в росте между концентрациями
<i>Pleurotus pulmonarius</i> <i>Pholiota squarrosoides</i> <i>Panellus serotinus</i> <i>Flammula alnicola</i> <i>Crucibulum sp.</i> <i>Grifola frondosa</i> <i>Pholiota aurivella</i> <i>Mycetinis scorodoni</i> <i>Fistulina hepatica</i>	<i>Ganoderma cf. lucidum</i> <i>Phaeolus schweinitzii</i> <i>Hericium erinaceus</i>	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>

Динамика роста штамма 1-й группы, *P. pulmonarius*

Максимальный рост при 0-5%. К — контроль (субкультура)

Рост после 12 недель заморозки с различными концентрациями глицерина

MGU FM 0063 *Pleurotus pulmonarius*

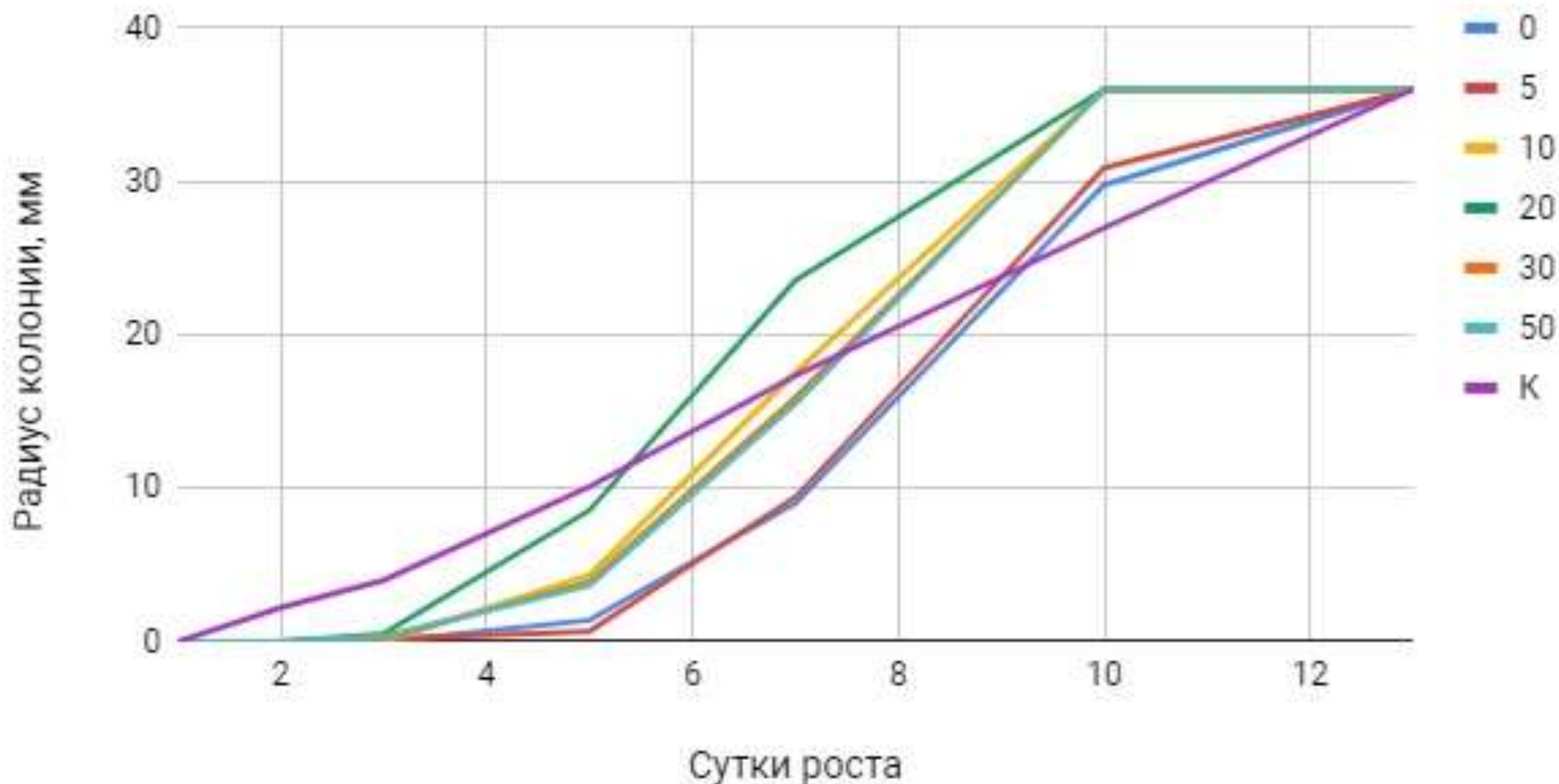


Динамика роста штамма 2-й группы, *G. lucidum*

Слабый рост при 0-5%. К — контроль (субкультура).

Рост после 12 недель заморозки с различными концентрациями глицерина

MGU FM 0060 Ganoderma cf. lucidum

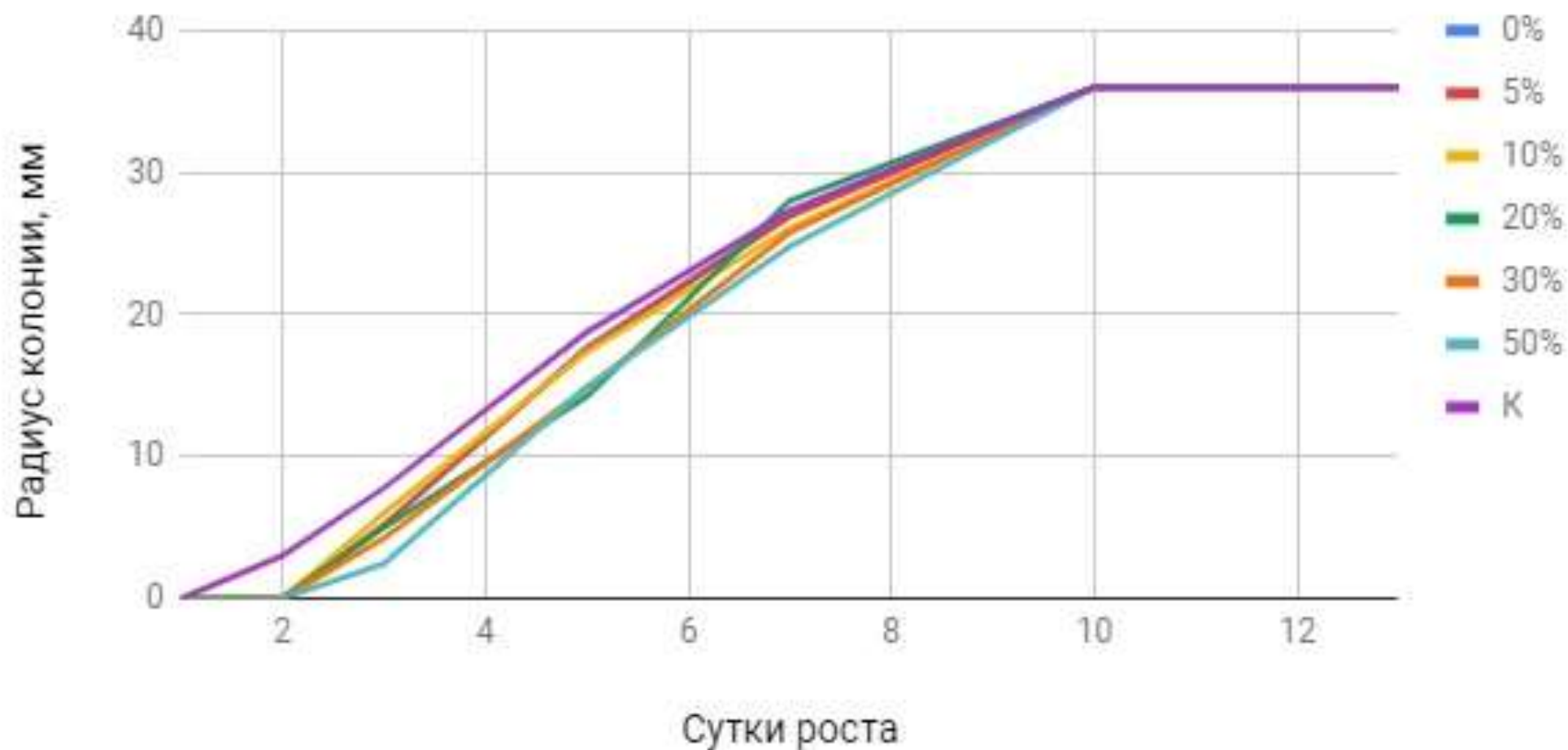


Динамика роста *P. cinnabarinus*

К — контроль (субкультура)

Рост после 12 недель заморозки с различными концентрациями глицерина

MGU FM 0078 *Puccinoporus cinnabarinus*



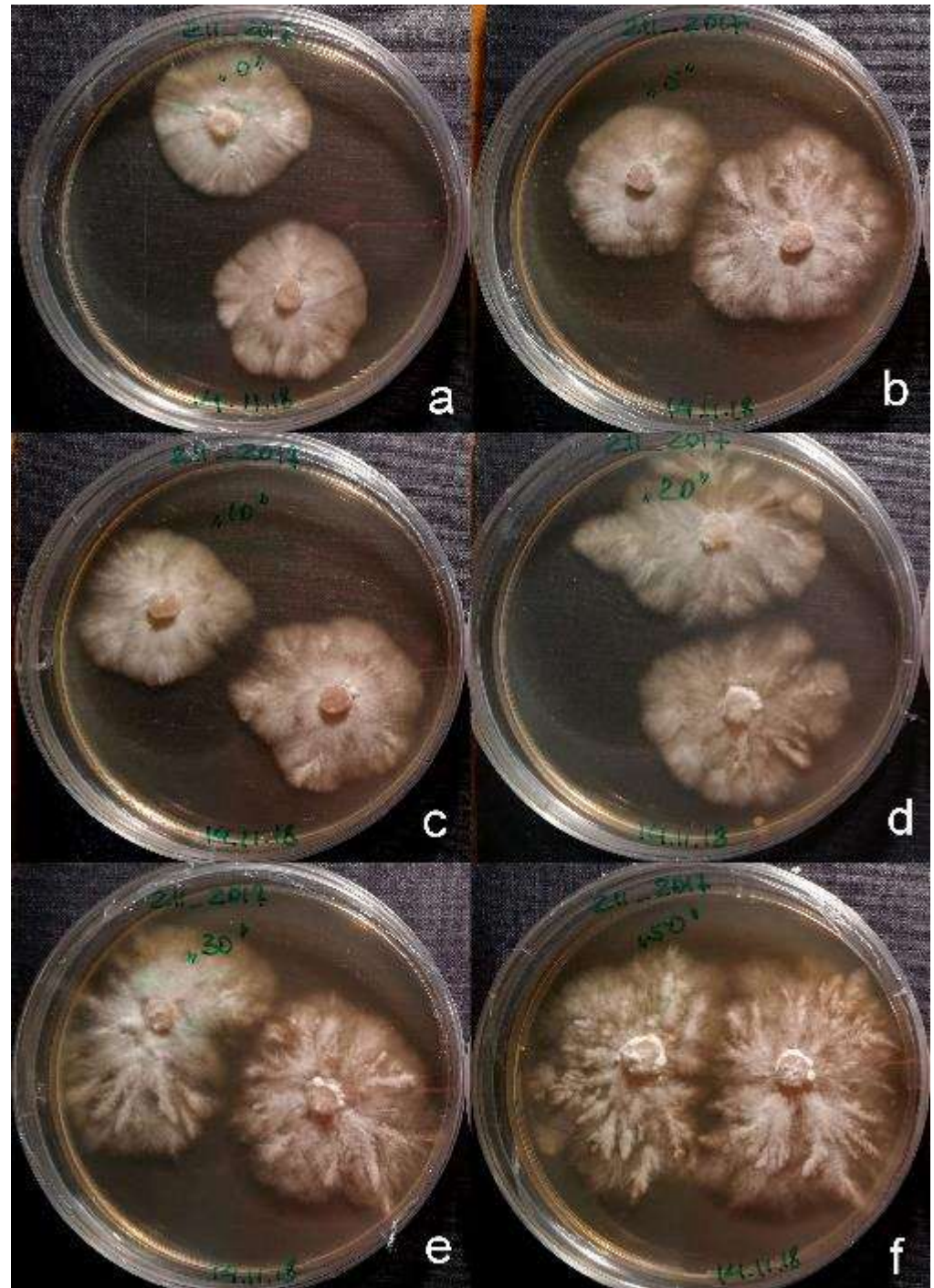
Морфология

Некоторые штаммы показывают заметное варьирование макроморфологии в зависимости от используемой концентрации глицерина.

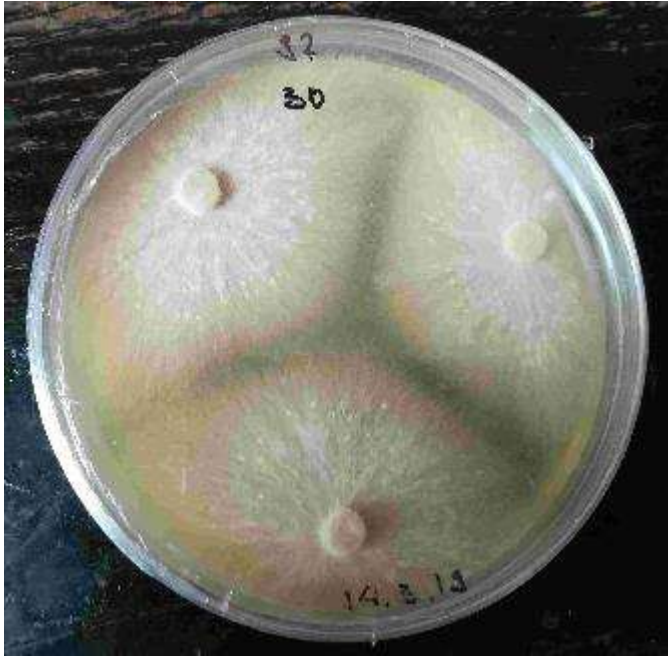
Hericium erinaceus.

Градация формы колонии от ровной к перистой.

a — контроль (0%), b — 5%,
c — 10%, d — 20%, e — 30%,
f — 50%.



Морфология (2)

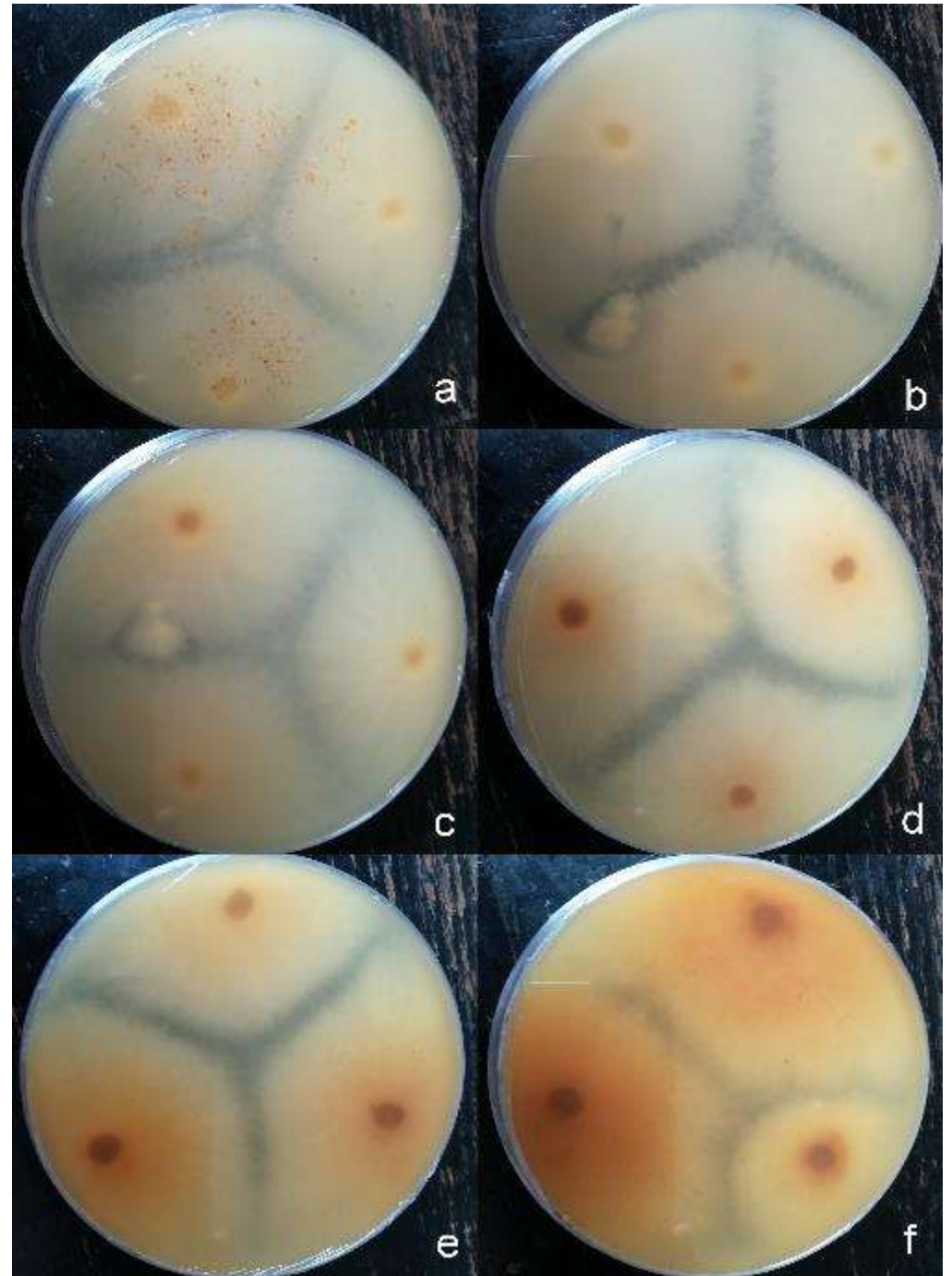


Crucibulum sp.

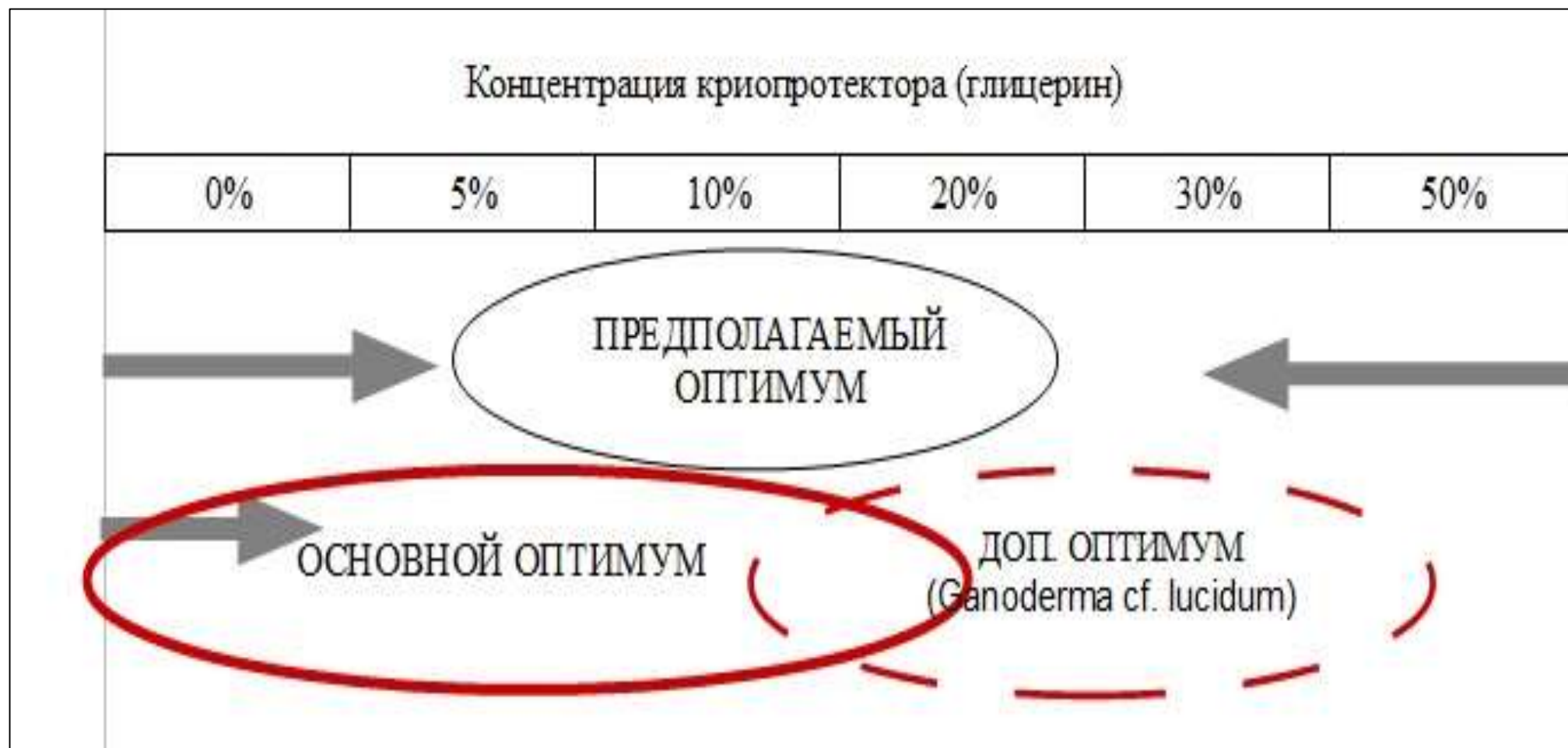
Градация окраски реверса колоний.

Аверс неизменный.

a — контроль (0%), b — 5%,
c — 10%, d — 20%, e — 30%,
f — 50%.



Результат эксперимента



Выводы

1. Концентрация глицерина 20% (кафедральный протокол) приемлема для всех опытных штаммов.
2. Наилучшие показатели роста в эксперименте в основном достигались при использовании 0-10% глицерина, реже при 20-30%.
3. Вводный протокол для нового штамма при использовании глицерина должен включать минимум две полярные концентрации — 5-10% и 20-30%.
4. Использование концентраций выше 30% может вызвать гибель культур макромицетов.

Спасибо за внимание!



Выживаемость

	протектор	вода	Глицерин					глюкоза	сахароза	ксилоза
	концентрация		5%	10%	20%	30%	50%	5%	10%	5%
штамм	название									
MGU FM 0060	<i>Ganoderma cf. lucidum</i>	14/14	14/14	13/14	14/14	14/14	13/14	3/6	6/6	2/6
MGU FM 0063	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	9/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0067	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0072	<i>Panellus serotinus</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0076	<i>Pholiota squarrosoides</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0078	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0090	<i>Flammula alnicola</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	11/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0097	<i>Crucibulum sp.</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0103	<i>Grifola frondosa</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0157	<i>Pholiota aurivella</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0211	<i>Hericium erinaceus</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0212	<i>Mycetinis scorodonius</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	6/6	6/6	6/6
MGU FM 0214	<i>Fistulina hepatica</i>	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	5/6	6/6	6/6

Усредненный латентный период

	протектор	вода	Глицерин					глюкоза	сахароза	ксилоза
	концентрация		5%	10%	20%	30%	50%	5%	10%	5%
штамм	название									
MGU FM 0060	<i>Ganoderma cf. lucidum</i>	4	3	4	3	4	4	3	4	5
MGU FM 0063	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	3	3	3	3	4	5	2	2	3
MGU FM 0067	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	9	9	8	7	8	8	8	7	7
MGU FM 0072	<i>Panellus serotinus</i>	3	3	3	3	3	4	3	3	3
MGU FM 0076	<i>Pholiota squarrosoides</i>	4	4	4	3	4	4	4	3	4
MGU FM 0078	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	3	3	3	3	3	3	3	6	3
MGU FM 0090	<i>Flammula alnicola</i>	3	3	3	4	6	9	3	3	3
MGU FM 0097	<i>Crucibulum sp.</i>	2	2	2	3	3	3	2	2	2
MGU FM 0103	<i>Grifola frondosa</i>	3	4	5	6	5	7	4	3	5
MGU FM 0157	<i>Pholiota aurivella</i>	3	3	3	3	3	3	2	2	2
MGU FM 0211	<i>Hericium erinaceus</i>	4	4	4	5	6	7	4	4	4
MGU FM 0212	<i>Mycetinis scorodonius</i>	3	3	3	3	3	6	4	2	4
MGU FM 0214	<i>Fistulina hepatica</i>	3	3	3	3	3	4	4	3	4

Фоторафии плодовых тел опытных видов.

<https://fungi.com/products/ganoderma-lucidum-culture>

https://www.mushroomexpert.com/pholiota_squarrosoides.html

<http://gribysedobnye.ru/korolevskie-opiata-cheshuichatka-zolotistaia>

<https://wikigrib.ru/veshenka-legochnaya/>

http://pagan-cancan.by/species/Mycetinis_scorodonius/Mycetinis_scorodonius.htm

<https://www.rusticmushrooms.co.uk/product/lions-mane-hericium-erinaceus/>

<https://waarneming.nl/species/673171/>

https://en.wikipedia.org/wiki/Pycnoporus_cinnabarinus

<https://www.first-nature.com/fungi/grifola-frondosa.php>

<http://mycoweb.ru/GIF/apic.php?level=picture&id=284257>

<https://www.flickr.com/photos/atlapix/27135653361>