

Біологічні особливості рідкісного гриба *Sparassis nemecii* (*Sparassidaceae*, *Polyporales*) на рослинних субстратах в чистій культурі

Марія В. ПАСАЙЛЮК

Національний природний парк "Гуцульщина"
вул. Дружби 84, Косів 78600, Івано-Франківська обл., Україна
mariia.pasailiuk@gmail.com

Pasailiuk M.V. 2019. **Biological peculiarities of a rare mushroom *Sparassis nemecii* (*Sparassidaceae*, *Polyporales*) on plant substrates in pure culture.** *Ukrainian Botanical Journal*, 76(6): 493–498.

Hutsulshchyna National Nature Park
84 Druzhby Str., Kosiv 78600, Ivano-Frankivsk Region, Ukraine

Abstract. Mycelium growth in culture and morphological features of *Sparassis nemecii* 2327 on eleven multicomponent substrates were studied. The substrate components included: wheat grain, sunflower husk, pumpkin husk, peanut husk, wheat straw, conifer shavings, and plant litter from coniferous forest. The substrate components and their ratios suitable for obtaining mycelium of the fungus were selected. It was established that wheat grain is a compulsory substrate component for productive cultivation of the mycelium of *S. nemecii*. The combination of the components and mechanical properties of the substrate are also important factors for mycelium growth of *S. nemecii*. Densely packed substrates were found to be more appropriate. Substrates no. 2 (wheat grain/ conifer shavings/ sunflower husk/ wheat straw – 8/2/1/1) and no. 7 (wheat grain/ forest litter – 1/2) were the best compositions suitable for mycelium growth of *S. nemecii* under laboratory conditions. By the 25th day of the experiment, a degree of overgrown substrate no. 2 and no. 7 was 85% and 75%, respectively. Vegetative mycelium obtained on the substrate no. 2 was dense, of creamy milk color, with a small number of air hyphae. White mycelium with a large number of air hyphae was observed on other substrates, with separate components clearly visible. Under laboratory conditions we have not obtained fungal fruit bodies similar in size and weight to natural ones. Thus our further experiments will be carried out to determine optimal cultivation conditions (temperature, light, pH, etc.) for growing fruit bodies of *S. nemecii* as well as substrate weight and its components ratio, based on the already obtained data on mycelium growth.

Keywords: cultivation, mycelium overgrowth, overgrown substrate, wheat grain

Submitted 02 January 2019. Published 29 December 2019

Пасайлюк М.В. 2019. **Біологічні особливості рідкісного гриба *Sparassis nemecii* (*Sparassidaceae*, *Polyporales*) на рослинних субстратах в чистій культурі.** *Український ботанічний журнал*, 76(6): 493–498.

Реферат. Досліджена специфіка росту і морфологічні особливості *Sparassis nemecii* 2327 на 11 композиціях рослинних субстратів різного складу, що включали: зерно пшениці, стружку хвойних порід дерев, лушпиння соняшника, гарбуза та арахісу, соломку пшениці, лісову підстилку з-під дерев хвойних порід. Підібрані субстрати, компоненти та співвідношення яких придатні для отримання міцелію гриба. Встановлено, що для успішного вирощування міцелію *S. nemecii* обов'язковим компонентом субстрату є зерно пшениці. Важливими факторами також є природа складових, спосіб їхнього комбінування та механічні властивості субстрату – міцелій *S. nemecii* краще росте на субстраті, компоненти якого в силу фізичних особливостей їхньої структури розташовуються щільно. Цим критеріям відповідають субстрати № 2 (зерно пшениці/ стружка хвойних/ лушпиння соняшника/ солома пшениці – 8/2/1/1) та № 7 (зерно пшениці/лісова підстилка – 1/2), які є найкращими композиціями для вирощування міцелію *S. nemecii* в лабораторних умовах. Ступінь обростання субстрату № 2 та № 7 до 25-ї доби експерименту складав 85% та 75% відповідно. Вегетативний міцелій *S. nemecii* 2327, отриманий на субстраті № 2, щільний, молочно-кремове забарвлення, з невеликою кількістю повітряних гіф. На інших субстратах спостерігали міцелій білого кольору з великою кількістю повітряних гіф, добре видимі окремі компоненти субстрату. В лабораторних умовах ми не отримали характерних для природних умов плодових тіл гриба, тому наступні наші експерименти, присвячені вирощуванню плодових тіл *S. nemecii* в лабораторії, будуть пов'язані із коригуванням ваги субстратів та співвідношенням їхніх компонентів і підбором оптимальних умов культивування (температура, світло, рН, тощо) з урахуванням отриманих відомостей щодо специфіки росту міцелію гриба.

Ключові слова: зерно пшениці, культивування, обростання субстрату міцелієм

Вступ

Рід *Sparassis* Fr. на території України представлений трьома видами: *S. laminosa* Fr., *S. crispa* (Wulfen) Fr. і *S. nemecii* Pilát & Veselý. (Heluta, 2009; Leshan, Pakhomov, 2009; Heluta et al., 2016; Мукчайлова, 2017).

В Україні *S. nemecii* вперше був виявлений у 2009 р. неподалік м. Косів (Івано-Франківська обл.) у Національному природному парку "Гуцульщина" під *Abies alba* Mill. В.П. Гелютою (Heluta et al., 2016; Мукчайлова, 2017). Плодові тіла утворюються на корінні, біля основи стовбурів старих дерев *Abies* sp. у серпні–жовтні. Гриб є сапротрофом або інколи розглядається як паразит *Abies* sp. і є слабким патогеном, що спричинює буру гниль (Heluta et al., 2016).

В Україні цей вид є кандидатом на включення до Червоної книги України (Heluta et al., 2016). Є зникаючим (категорія EN – Endangered) у Червоному списку грибів Чеської республіки (Holec, Veran, 2006). Наразі охорона виду здійснюється в НПП "Гуцульщина", а культура *S. nemecii* 2327 зберігається в Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, яка є об'єктом національного надбання України та внесена в міжнародні бази даних Всесвітньої федерації колекцій культур – WDCM (http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1152/) (Lomberg et al., 2015; Bisko et al., 2016). Культура отримана зі спор гриба, знайденого на території НПП "Гуцульщина" в 2015 р. (Bisko et al., 2016); її культурально-морфологічні властивості добре вивчені фахівцями Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (Мукчайлова, 2017).

Проте питання підбору рослинних субстратів для вирощування міцелію *S. nemecii* задля отримання плодових тіл гриба наразі не досліджене. Гриб має харчову цінність – білий щільний м'якуш з приємним солодкуватим смаком і запахом та значні розміри плодового тіла. Так, знайдені екземпляри сягали 10–30 см у діаметрі й 5–15 см заввишки (Heluta et al., 2016). Зважаючи на ці характеристики, культивування виду для отримання плодових тіл є комерційно перспективним. Експерименти з можливості відтворення виду в лабораторних умовах важливі для отримання відомостей щодо специфіки росту культури на рослинних субстратах і підбору оптимальних умов культивування для

його плодоношення. Також ці результати мають значення для збереження виду.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження слугувала чиста культура *Sparassis nemecii* 2327, отримана з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Динаміку росту вегетативного міцелію *S. nemecii* досліджували на таких комбінаціях субстратів (співвідношення за масою):

- № 1 – зерно пшениці/стружка хвойних/лушпиння соняшника – 2/2/1;
- № 2 – зерно пшениці/стружка хвойних/лушпиння соняшника/солома пшениці – 8/2/1/1;
- № 3 – зерно пшениці/лушпиння гарбуза/лушпиння соняшника/лушпиння арахісу – 4/2/1/1;
- № 4 – стружка хвойних/лушпиння соняшника – 2/1;
- № 5 – стружка хвойних/лушпиння соняшника/солома пшениці – 2/1/1;
- № 6 – лушпиння гарбуза/лушпиння соняшника/лушпиння арахісу – 2/1/1;
- № 7 – зерно пшениці/лісова підстилка з-під дерев хвойних порід – 1/2;
- № 8 – зерно пшениці/лісова підстилка з-під дерев хвойних порід/стружка хвойних – 1/1/1;
- № 9 – зерно пшениці/лісова підстилка з-під дерев хвойних порід/стружка хвойних/ солома – 1/1/1/1;
- № 10 – зерно пшениці/лісова підстилка з-під дерев хвойних порід/солома – 1/1/1;
- № 11 – зерно пшениці/стружка хвойних/солома – 1/1/1.

Суміш стружки дерев хвойних порід отримували шляхом стругання здорової деревини *Abies alba* та *Pinus sylvestris* L. (розміри дерев'яних часток 10 × 10–40 × 2 мм). Лушпиння соняшника, гарбуза, арахісу попередньо просушували, зерно пшениці проварювали впродовж 25–30 хв із розрахунку 10 кг зерна на 10 л води. Після просушування перемішували із гіпсом (1 кг зерна – 12 г гіпсу) та крейдою (1 кг зерна – 3 г крейди).

Лісову підстилку збирали з-під дерев хвойних порід (*Abies alba*, *Pinus sylvestris*) та просушували впродовж 1 год за температури 60 °С. В експерименті використовували висушену, подрібнену до 2,5–5,0 см солому пшениці.

Компоненти кожного субстрату ретельно перемішували, усі субстрати зволожували (до вологості 60%) та розкладали в 3-літрові ємності. Кожен термостійкий пакет містив 600 ± 15 г зволоженого субстрату, рН 5.5 (рН вимірювали на рН-метрі марки МР-103, Тайвань). Ємності з усіма варіантами субстратів автоклали впродовж 90 хв за умов тиску 2 атм та стерильно інокулювали посівним міцелієм 25-денного віку, вирощеним на солодовому агарі з додаванням тирси ялиці за температури $26 \pm 0,1$ °С та рН 5,5. У кожену ємність вносили колонію міцелію з чашки Петрі діаметром 90 мм. Посіви інкубували за температури $26 \pm 0,1$ °С та 30% вологості. Щодня візуально контролювали та реєстрували ступінь обростання субстрату міцелієм культури. Для цього лінійкою вимірювали висоту обростання субстрату міцелієм із чотирьох взаємно перпендикулярних боків ємності. Обчислювали середні значення та визначали (у %) висоту оброслого міцелієм субстрату. Враховуючи той факт, що в деяких випадках ріст міцелію відбувався по всьому субстрату, а гіфи інколи не були добре помітні, ми ввели поняття коефіцієнту повноти обростання субстрату. Його встановлювали, визначаючи видимі площі, повністю заповнені міцелієм (без можливості ідентифікації природи субстрату), та площі, де компоненти субстрату добре проглядалися, і ознак їхнього обростання міцелієм не було (Pasailiuk et al., 2018). Площу вимірювали, керуючись загальноприйнятими математичними методами.

Прийняли коефіцієнти повноти обростання субстрату від 0,1 до 1,0 де: 0,1 – добре видимі компоненти субстрату, поодинокі тяжі міцелію пронизують усю товщу пакету (рис. 1 А, В); 1,0 – не вдається ідентифікувати компоненти субстрату, у полі зору тільки міцелій; $0,1 < x < 1,0$, де x – відношення площі, повністю оброслої міцелієм до загальної площі.

Приклади оцінювання коефіцієнту повноти обростання субстрату (0,1; 0,25; 0,5; 0,75) наведені на рис. 1.

Обростання субстрату визначали шляхом помноження висоти оброслого міцелієм субстрату (%) на коефіцієнт повноти обростання субстрату.

Через 30 діб після інокуляції температуру інкубації знижували до 20 °С, вологість підвищували до 60%. Всі досліди проводили у чотирьох біологічних повторностях. Статистичну обробку отриманих

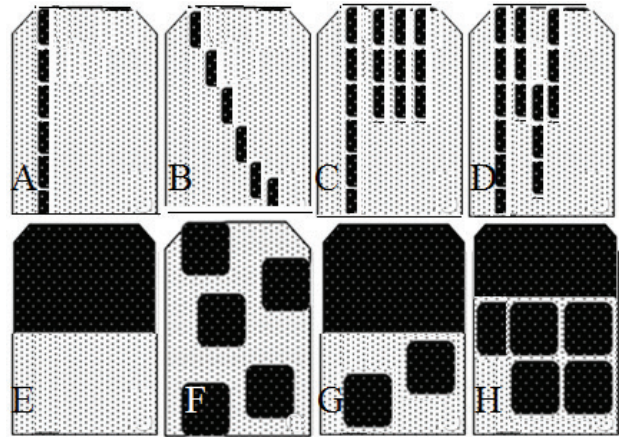


Рис. 1. Приклади розрахунку коефіцієнту повноти обростання субстрату міцелієм *Sparassis nemecii* 2327. А, В: 0,1%; С, D: 0,25; Е, F: 0,5; G, H: 0,75

Fig. 1. Examples of calculation of the coefficient of substrate overgrowth by mycelium of *Sparassis nemecii* 2327. А, В: 0.1; С, D: 0.25; Е, F: 0.5; G, H: 0.75

результатів проводили з використанням програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).

Результати та обговорення

На основі аналізу специфіки росту *S. nemecii* 2327 на рослинних субстратах різного складу встановлено, що із апробованих субстратів найкращими комбінаціями для вирощування міцелію *S. nemecii* є субстрати № 2 та № 7, ступінь обростання яких до 25-ої доби експерименту складав 85% та 75% відповідно (рис. 2).

Використання субстратів № 8–11 виявилось менш успішним, адже міцелій заповнював їх тільки на 28–50%, а використання субстратів № 1–6 є недоцільним.

Аналізуючи отримані результати, ми звернули увагу на те, що негативний результат мав місце у тих випадках, коли в субстраті були відсутні зерна пшениці (субстрати № 4, 5, 6). Отже, присутність цього компоненту є однією з умов успішного вирощування міцелію *S. nemecii*. Але комбінації, використані в субстратах № 1 і № 3, виявилися непридатними для обростання міцелієм, хоча й містили зерно пшениці. Імовірно причиною цього є їхня невисока щільність.

Очевидно, важливу роль при обростанні полікомпонентних субстратів має не тільки їхня природа, але й ступінь подрібнення та ущільнення. З цим фактом ми вже стикалися при культивуванні

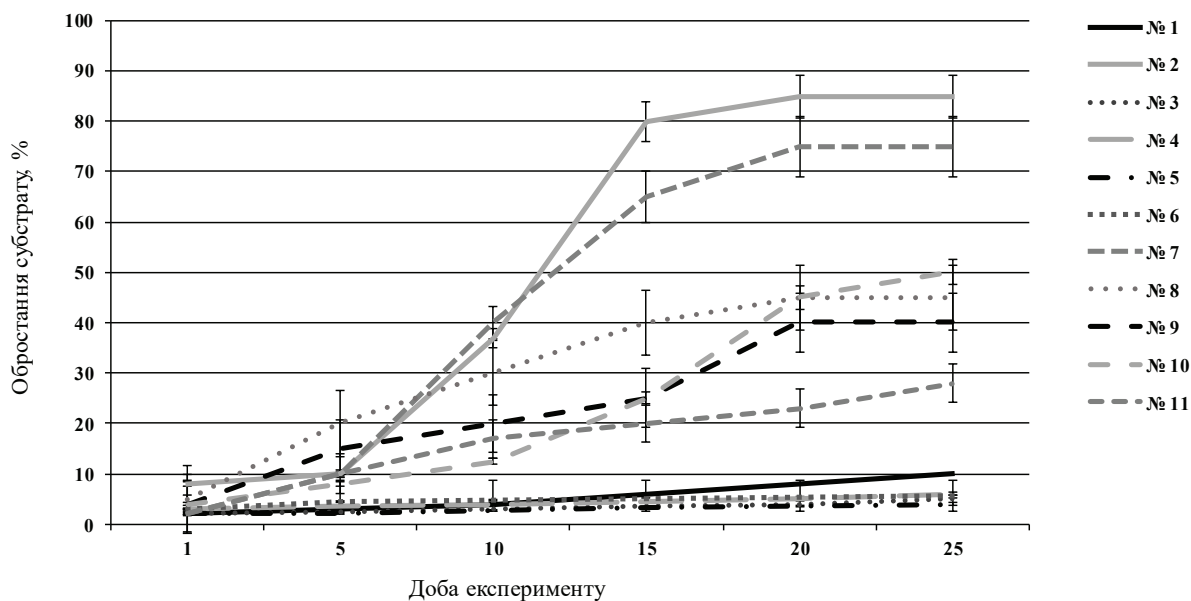


Рис. 2. Динаміка обростання міцелієм *Sparassis nemecii* 2327 комбінованих досліджених субстратів № 1–11 (розшифрування див. в тексті)

Fig. 2. Dynamics of overgrowth of the combined substrates nos 1–11 by mycelium of *Sparassis nemecii* 2327 (see legend in the text)

Anthurus archeri (Berk.) E.Fisch., коли було показано, що механічні якості субстрату важливі для його обростання міцелієм гриба (Pasailiuk et al., 2018). У випадку із *S. nemecii* міцелій краще росте на субстраті, компоненти якого розташовуються щільно. Так, у субстраті № 2 висока щільність досягається за рахунок зерна пшениці (вміст якого досягає 75%), у субстраті № 7 – за рахунок зерна пшениці та лісової підстилки.

Цим припущенням можна пояснити нижчі показники обростання субстратів № 8–11, в яких застосування стружки та соломи не перешкоджає міцелію *S. nemecii* обростати весь субстрат, проте зазначені компоненти залишаються не оброслими і добре помітними на 20-ту добу експерименту (рис. 3).

На субстраті № 2 ми спостерігали щільний, молочно-кремового забарвлення міцелій з невеликою кількістю повітряних гіф (рис. 3, А). В окремих місцях на поверхні субстрату можна було ідентифікувати солому, стружку, лущиння соняшника. Зерно пшениці повністю обросло міцелієм, і присутність окремих зерен не можливо було визначити візуально.

На субстратах № 7–11 спостерігали міцелій білого кольору з великою кількістю повітряних гіф, окремі компоненти субстрату були добре помітні.

На субстраті № 7 (зерно пшениці/лісова підстилка) зерно та хвоя не проглядалися, але гілочки хвойних можна було добре роздивитися (рис. 3, В). Стружку та/або солому, на відміну від зерна пшениці, добре видно було й на 20-ту добу експерименту на субстратах № 10 (рис. 3, С), № 11 (рис. 3, D), № 8 і № 9. Зважаючи на те, що рівень обростання цих субстратів не перевищував 28–50%, тобто повного обростання субстратів так і не відбулося, можна припустити, що використання соломи та/чи стружки хвойних у комбінаціях, запропонованих у нашому експерименті в субстратах № 8–11, виявилось зайвим.

Відмітимо, що в лабораторних умовах ми не отримали характерних плодових тіл гриба. Причиною утворення лише деформованих плодових тіл може бути як недостатня вага використаного в експерименті субстрату (600 г), так і невдало підібрані оптимальні умови культивування (температура, світло, рН тощо). Імовірно, слід також відкоригувати співвідношення компонентів субстрату. Перевірка цього припущення потребує подальших експериментів з вирощування *S. nemecii* в лабораторії. Зауважимо, що в літературі наводиться морфологія виключно зрілих плодових тіл гриба *S. nemecii* в природі, без опису процесу їхнього формування.

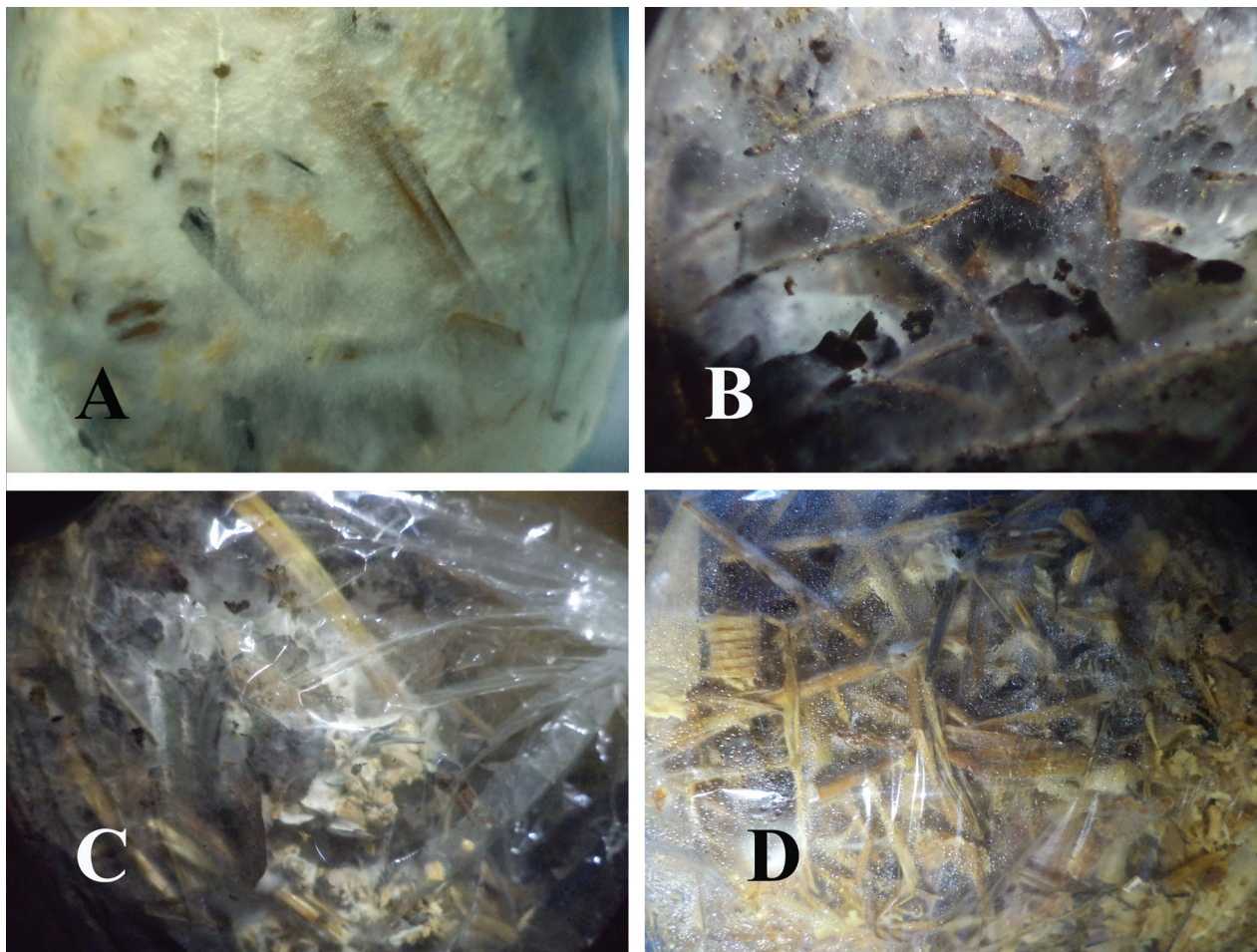


Рис. 3. Міцелій *Sparassis nemecii* 2327 на комбінованих субстратах на 20-ту добу експерименту. А: на субстраті № 2; В: на субстраті № 7; С: на субстраті № 10; D: на субстраті № 11

Fig. 3. Mycelium of *Sparassis nemecii* 2327 on combined substrates. A: substrate no. 2; B: substrate no. 7; C: substrate no. 10; D: substrate no. 11, 20th day of experiment

Висновки

Досліджена специфіка росту та морфологічні особливості *Sparassis nemecii* 2327 на рослинних субстратах різного складу. В лабораторних умовах підібрані компоненти субстратів, співвідношення та механічні характеристики яких придатні для отримання міцелію гриба. Встановлено, що для успішного вирощування міцелію *S. nemecii* обов'язковим компонентом є зерно пшениці. Важливими факторами також є природа складових, спосіб їхнього комбінування та механічні властивості субстрату. Встановлено, що міцелій *S. nemecii* краще росте на субстраті, компоненти якого розташовуються щільно. Цим критеріям відповідають субстрати "зерно пшениці/

стружка хвойних/лушпиння соняшника/солома пшениці" та "зерно пшениці/лісова підстилка," що мають найоптимальнішу композицію для вирощування міцелію *S. nemecii* в лабораторних умовах. Ступінь обростання цих субстратів на 25-ту добу експерименту склав 85% та 75% відповідно.

В лабораторних умовах ми не отримали характерних для природних умов плодових тіл гриба. Подальші експерименти, присвячені вирощуванню плодових тіл *Sparassis nemecii* в лабораторії, будуть пов'язані із коригуванням ваги субстратів та співвідношенням їхніх компонентів, підбором оптимальних умов культивування (температура, світло, рН тощо) з урахуванням отриманих відомостей щодо специфіки росту міцелію гриба.

Подяки

Автор висловлює щиро подяку співробітникам відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України Н.А. Бісько, М.Л. Ломберг, О.Б. Михайлові за надану для досліджень культуру *Sparassis nemecii* 2327.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Bisko N.A., Lomberg M.L., Mytropolska N.Yu., Mykchaylova O.B. 2016. *Kolektsiya kultur shapyinkovykh hrybiv (IBK) (IBK Mushroom Culture Collection)*. Kyiv: Alterpress, 120 pp. [Бісько Н.А., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю., Михайлова О.Б. 2016. *Колекція культур шапинкових грибів (ІВК)*. Київ: Альтерпрес, 120 с.].
- Heluta V.P. 2009. *Sparassis crispa*. In: *Chervona knyha Ukrainy. Roslynnyi svit (Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom)*. Ed. Ya.P. Didukh. Kyiv: Globalkonsalting, p. 831. [Гелюта В.П. 2009. *Sparassis crispa*. В кн.: *Червона книга України. Рослинний світ*. Ред. Я.П. Дідух. Київ: Глобалконсалтинг, с. 831].
- Heluta V.P., Fokshei S.I., Derzhypilskyi L.M. 2016. In: *Rare plants and fungi of Ukraine and adjacent areas: implementing conservation strategies. Abstracts of the fourth International conference*. Kyiv: Palyvoda, pp. 182–184. [Гелюта В.П., Фокшей С.І., Держипільський Л.М. 2016. Перші знахідки в Україні рідкісного гриба *Sparassis nemecii* (Sparassidaceae). У зб.: *Рідкісні рослини і гриби України та прилеглих територій: реалізація природоохоронних стратегій: матеріали четвертої міжнародної наукової конференції (Київ, 16–20 травня, 2016 р.)*. Київ: Паливода, с. 182–184].
- Holec J., Beran M. [Eds] 2006. *Červený seznam hub (makromycetů) České republiky [Red list of fungi (macrofungi) of the Czech Republic]*. *Příroda*, 24: 1–282.
- Leshan T.A., Pakhomov O.Y. 2009. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Series Biology. Ecology*, 17(1): 115–120. [Лешан Т.А., Пахомов О.Є. 2009. Раритетний фонд базидіоміцетів сходу України. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія Біологія. Екологія*, 17(1): 115–120].
- Lomberg M.L., Mykchaylova O.B., Bisko N.A. 2015. Mushroom culture collection (IBK) as a subject of national heritage of Ukraine. *Ukrainian Botanical Journal*, 72(1): 22–28. <http://doi.org/10.15407/ukrbotj72.01.022>
- Mykchaylova O.B. 2017. In: *Environmental, historical, cultural and ecoeducational aspects of Ukrainian Carpathians balanced development: materials of International research and practical conference dedicated to the 15th anniversary of Hutsulshchyna National Park*. Kosiv: PP Pavliuk, pp. 243–245. [Михайлова О.Б. 2017. Культурально-морфологічні властивості рідкісного гриба *Sparassis nemecii* (Sparassidaceae, Polyporales). У зб.: *Природоохоронні, історико-культурні та екоосвітні аспекти збалансованого розвитку Українських Карпат: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 15-й річниці НПП "Гуцульщина" (Косів, 8–9 червня 2017 р.)*. Косів: ПП Павлюк, с. 243–245].
- Pasailiuk M., Petrichuk Yu., Tsvyd N., Sukhomlyn M. 2018. The aspects of reproduction of *Clathrus archeri* (Berk.) Dring by re-situ method in the National Nature Park Hutsulshchyna. *Lešne Prace Badawcze*, 79(3): 287–293.

Рекомендує до друку М.М. Сухомлин