

В.М. ЛІНОВИЦЬКА¹, А.С. БУХАЛО²

¹ Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

просп. Перемоги, 37, Київ, 03057, Україна

² Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України

вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

**КУЛЬТУРАЛЬНІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ
ОСОБЛИВОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ГРИБА
SCHIZOPHYLLUM COMMUNE FR.
(*BASIDIOMYCETES*) НА АГАРИЗОВАНИХ
ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ**

Ключові слова: *Schizophyllum commune*, агаризовані живильні середовища, ріст, колонія, морфологія, міцелій, скануюча електронна мікроскопія.

Лікарський гриб *Schizophyllum commune* Fr. (*Schizophyllaceae* Quél., *Agaricales* Clem., *Basidiomycetes* [7]) — сапротрофний вид, поширений на всіх континентах та у різних кліматичних зонах, крім Арктики. Є ксилотрофом, росте на відмираючих і мертвих гілках, стовбурах і пеньках листяних й хвойних порід дерев і кущів, часто трапляється на парканах і стінах дерев'яних будівель. У країнах Південної Азії плодові тіла гриба культивують на рослинних субстратах та вживають в їжу.

Лікарські властивості *Schizophyllum commune* були з давніх часів відомі у східній медицині, в якій його використовували для підвищення імунітету, при зниженому тонусі, а також для лікування різних гінекологічних хвороб і раку молочної залози [15]. В наш час на основі *S. commune* виробляють лікарські препарати з протипухлинною, протизапальною, антибактерійною, імуномодулюючою та гепатопротекторною дією. Так, в Японії з культуральної рідини цього гриба отримують препарати «Sonifilan» (соніфілан), «Schizofyllan» (шизофіллан) та «SPG», які використовують при лікуванні різних видів онкозахворювань [6, 8, 10, 13, 14]. Лікувальні властивості цих препаратів, зокрема й протипухлинні, зумовлені їх безпосереднім впливом на різні ланки імунітету. Зокрема, дослідження шизофіллану показало, що він збільшує синтез Т-хелперних клітин, макрофагів і нейтрофілів, підвищує чутливість цитотоксичних і кілерних клітин, а також активує систему комплементу [9, 11–13]. Основною діючою речовиною лікарських засобів, вироблених з *S. commune*, є полісахарид β-D-глюкан (головні ланцюги складаються із залишків глюкози, поєднаних β-1,6-глікозил-зв'язком, а в деяких місцях — β-1,3-зв'язком). Дослідження, проведені А. Hirata та співавторами [5], показали, що шизофіллан можна застосовувати при лікуванні хворих на ВІЛ.

© В.М. ЛІНОВИЦЬКА, А.С. БУХАЛО, 2005

Schizophyllum commune поширений в Україні на багатьох видах дерев і кущів. У Криму, наприклад, за даними В.П. Ісікова [2], плодові тіла *Sch. commune* знайдено на 29 видах дерев. Він є одним із найважливіших серед лікарських видів вищих лігнотрофних базидіоміцетів з погляду створення у нашій країні біотехнологій для одержання медичних препаратів імуномодулюючої, протипухлинної, антивірусної та іншої дії на його основі. Необхідною передумовою створення такої біотехнології є одержання чистих культур *Sch. commune* з природних ізолятів і проведення скринінгу штамів за різними критеріями. Проте в літературі недостатньо описані культурально-морфологічні та мікроскопічні характеристики цього гриба, які потрібно знати для контролювання чистоти культури на всіх стадіях біотехнологічного процесу.

Представлена робота є результатом досліджень штамів *Sch. commune*, ізольованих авторами протягом 2000—2001 рр. з природних локалітетів в Україні, та отриманих із інших колекцій, зокрема, відбір штамів на різних живильних середовищах за критеріями росту, морфологічними характеристиками колоній та міцелію, відношенням до температурного фактора.

Матеріал і методи досліджень

Об'єктом досліджень був 21 штам *Sch. commune*. З них 8 штамів різного географічного походження були отримані з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК), а 13 ізольовані з плодкових тіл цього гриба, зібраних у різних регіонах України на стовбурах, гілках та деревині різних порід дерев протягом 2001—2002 рр. Ізольовані нами штами передано до колекції ІБК і наведені в роботі під її номерами. Штами 96, 97, 1713, 1714 і 5009 одержані з колекції Ботанічного інституту ім. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург, Росія).

Чисту культуру виділяли із спорового матеріалу за такою методикою. Плодове тіло гриба закріплювали голкою на ватно-марлевій пробці, якою закривали пробірку. Як живильне середовище використовували агаризоване пивне сусло (СА) з додаванням стрептоміцину в концентрації 45 тис. од/л середовища [3]. Плодове тіло попередньо тримали у стерильній чашці Петрі на вологому паперовому фільтрі декілька годин. Через 1—2 доби, після висипання спорового порошку на живильне агаризоване середовище, плодове тіло стерильно видаляли, а пробірку із спорами інкубували у термостаті при +28 °С до повного заростання міцелієм, тобто до утворення багатоспорової культури. Далі проводили 2—3 пасажі на СА з антибіотиком і культуру для зберігання переносили на середовище СА без антибіотика. Чистоту культури та її виду приналежність (відсутність сторонньої мікрофлори, морфологічні особливості колонії та міцелію, зокрема наявність пружок) контролювали як візуально, так і під мікроскопом.

Ріст і морфологію культур досліджували у чашках Петрі на чотирьох живильних середовищах різного складу: СА з 4 % цукру, картопляно-глюкозному агарі (КГА), середовищі Норкранс (СН) [1], а також на оригінальному синтетичному середовищі (СС) такого складу (г/л): NH_4NO_3 — 3, KH_2PO_4 —

1, K_2HPO_4 — 1, $MgSO_4 \cdot 3H_2O$ — 0,6, агар — 15, глюкоза — 10. Інокуляцію проводили міцеліальним диском діаметром 4 мм на живильне середовище у центр чашки Петрі. Для визначення лінійної швидкості росту та ростового коефіцієнта (РК) кожен добу вимірювали діаметр колонії у двох напрямках, висоту колонії (мм) та відмічали щільність колонії за трибальною системою (1 — розріджена, 2 — середня, 3 — щільна). Ростовий коефіцієнт обчислювали за формулою

$$PK = \frac{dhg}{t},$$

де d — діаметр колонії, мм; h — її висота, мм; g — щільність колонії, бали; t — вік колонії, доби [1].

Культивування на усіх середовищах проводили при температурі +4, +20, +28 та +37 °С у триразовій повторності.

Культури мікроскопічно досліджували у скануючому електронному мікроскопі (СЕМ) JSM-200. Для цього їх вирощували на покривних скельцях, розміщених на поверхні агаризованого середовища у чашках Петрі, фіксували у парах осмію та напилювали золотом за методикою, описаною раніше [1].

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті проведених досліджень було виявлено мінливість морфології колоній *Sch. commune* залежно від складу середовища і температури культивування (рис. 1). Практично всі штами на СА при різних температурах інкубації мали найбільш щільну колонію (3 бали) та висоту пухнастого повітряного міцелію 3—4 мм. На СА всі штами, крім 96 і 1769, мали пухнасту колонію білого кольору з рівним краєм, щільним непрозорим шаром субстратного міцелію, повітряний міцелій якої складався з добре розвинених гіф. Реверзум колоній залишався без змін. У штамів 96 і 1769 спостерігали шовковисті розпростерті колонії білого кольору з довгими радіальними гіфами та освітленим реверзумом.

На КГА всі штами мали шерстисту колонію білого кольору та незабарвлений реверзум. Щільність колонії була також велика (3 бали), але висота повітряного міцелію порівняно з СА була трохи меншою (2—3 мм). У деяких штамів спостерігали слабку радіальну зональність. На СН і СС спочатку відмічали ріст моношарового поверхневого міцелію, що утворював прозорий шар. З часом на СН у більшості штамів незалежно від температури інкубації формувалися пластівчасті колонії білого кольору з ділянками міцелію різної висоти (до 2 мм) та щільності (1—2 бали). Забарвлення реверзума не спостерігали.

Найкращим середовищем для всіх штамів при всіх досліджуваних температурах було СА, крім штаму 1763, у якого при +28 °С РК був найвищим на КГА (на СА — 77,1, на КГА — 85,7) (рис. 2).

Температурою, при якій відмічено найкращий ріст міцелію на СА, для більшості штамів була +20 °С (рис. 2). Проте п'ять штамів краще росли при температурі +28 °С. За значеннями РК на СА при оптимальній для кожного штаму температурі 67 % досліджених культур можна віднести до групи грибів, які

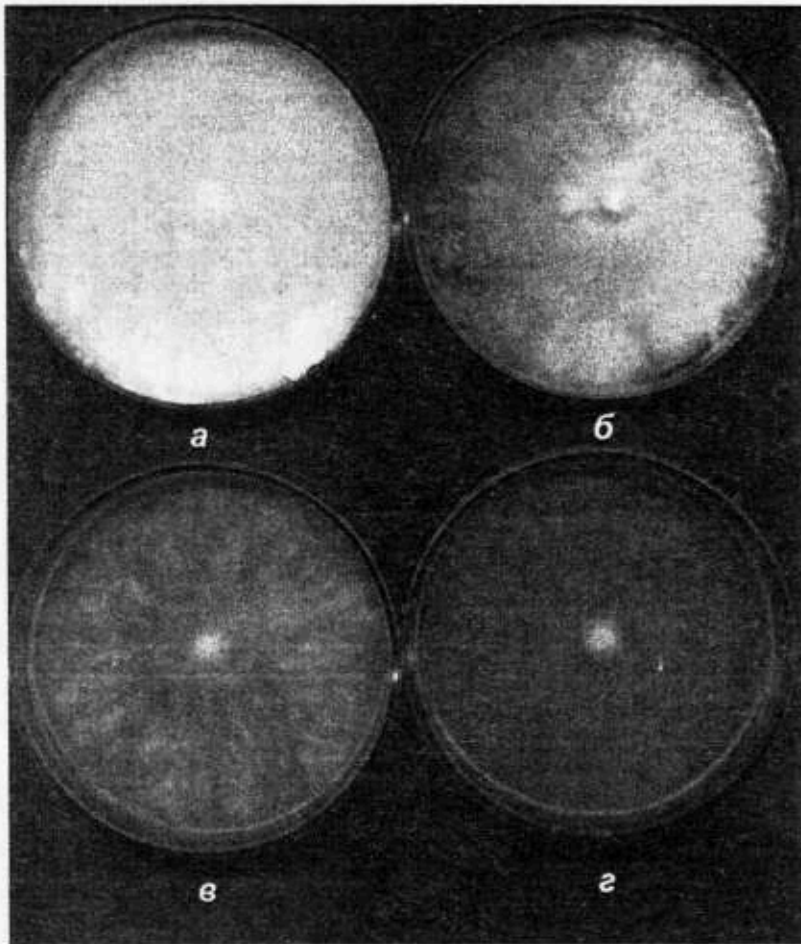


Рис. 1. *Schizophyllum commune* Fr. Колонії на агаризованих живильних середовищах (11 діб): *a* — агаризоване пивне сусло, *б* — картопляно-глюкозний агар, *в* — середовище Норкранс, *г* — синтетичне середовище

Fig. 1. *Schizophyllum commune* Fr. Colonies on agar medium (11 days): *a* — beer wort agar, *b* — potato dextrose agar, *v* — Norkrans agar, *z* — synthetic medium

швидко ростуть (РК в межах 100—154,3), а 33 % — до грибів із середньою швидкістю росту (РК в межах 50—100). Чашки Петрі зі штамми 96 на СА і КГА та 335, 441, 1761, 1762, 1763 і 1764 на СА повністю заростали міцелієм за 6 діб.

При +20—28 °С на середовищах СА, КГА та СН утворювалися примордії та сформовані плодові тіла (рис. 3). Появу плодових тіл спостерігали на 10—14-ту добу при +20 °С та на 12—18-ту — при +28 °С.

В усіх штамів при +37 °С найбільшу швидкість росту також спостерігали на СА та КГА, хоча РК був значно нижчим, ніж при +20—28 °С (відповідно, 6,8—100 та 9,3—154,3).

При +4 °С спостерігали або дуже повільний ріст колоній на всіх чотирьох середовищах (час заростання чашки Петрі >30 діб), або ріст міцелію був

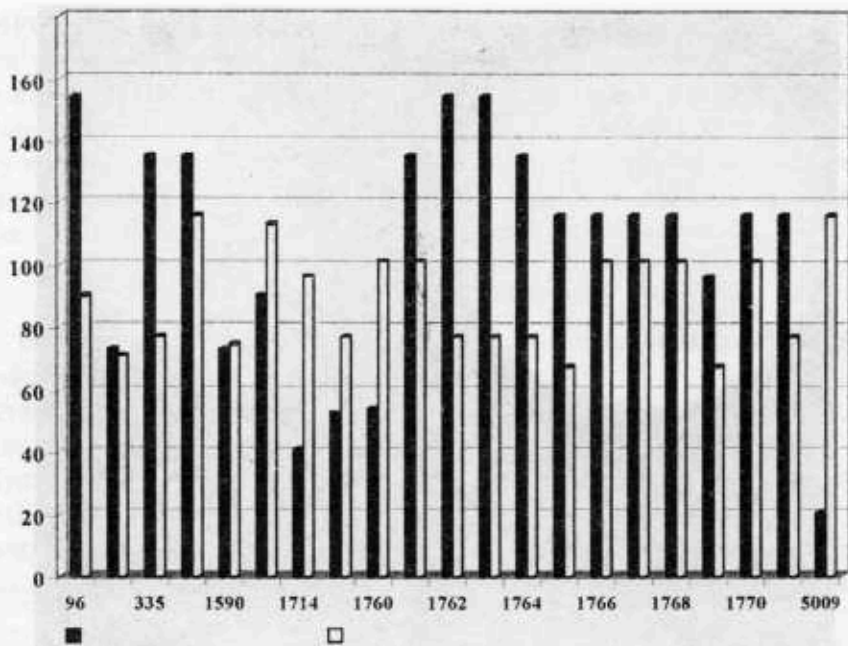


Рис. 2. Ростовий коефіцієнт (ПК) досліджених штамів *Sch. commune* на сусло-агарі при +20 і +28 °С
 Fig. 2. Grows rate of investigated strains *Sch. commune* on beer wort agar at +20 and +28 °C



Рис. 3. *Sch. commune*. Плодові тіла при культивуванні на сусло-агаровому середовищі
 Fig. 3. *Sch. commune*. Fruit bodies on beer wort agar



Рис. 4. *Sch. commune*. Пряжка на гіфі (СЕМ, $\times 18\,000$)

Fig. 4. *Sch. commune*. Clamp on a hyphae (SEM, $\times 18\,000$)

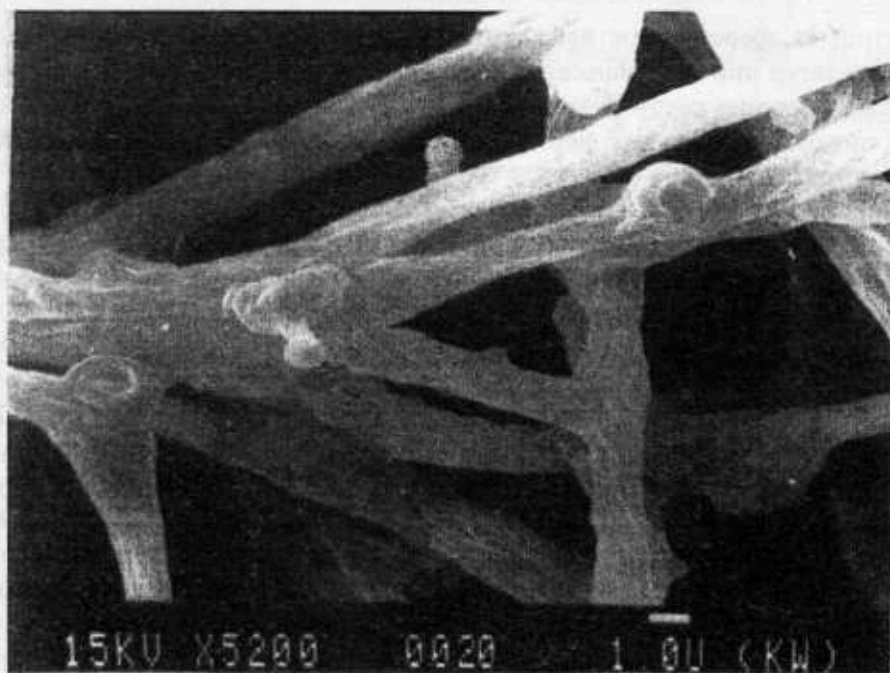


Рис. 5. *Sch. commune*. Анастомози, пряжки та екскреторні клітини на гіфах (СЕМ, $\times 5200$)

Fig. 5. *Sch. commune*. Anastomoses, clamps and excretoric cells on a hyphae (SEM, $\times 5200$)

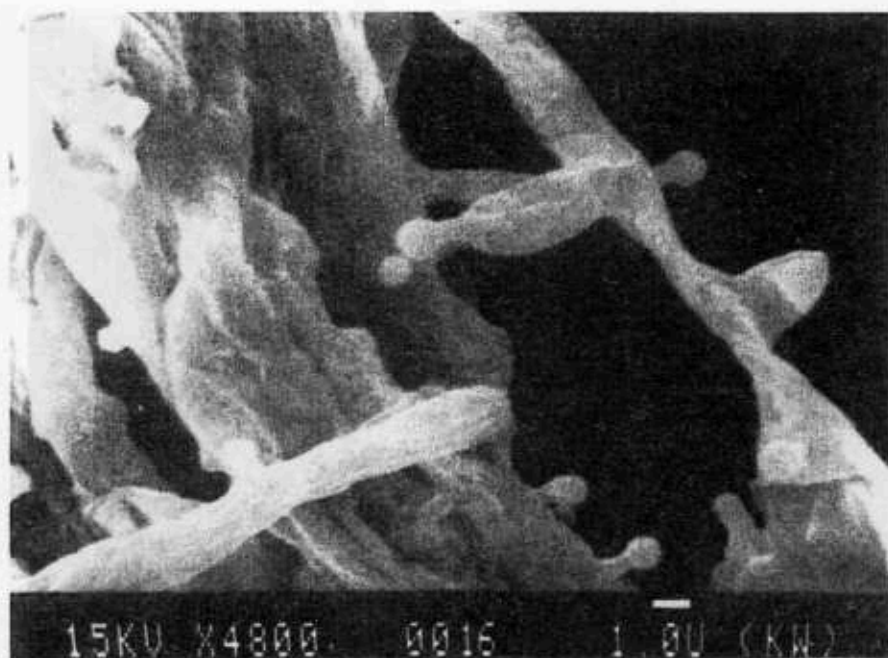


Рис. 6. *Sch. commune*. Екскреторні клітини на гіфах (СЕМ, $\times 4800$)

Fig. 6. *Sch. commune*. Excretoric cells on a hyphae (SEM, $\times 4800$)

відсутній із збереженням його життєздатності, що засвідчує поновлення росту культур при їх перенесенні в умови з температурою $+20-28^{\circ}\text{C}$. Хоча лінійна швидкість росту штамів при $+4^{\circ}\text{C}$ була дуже низькою, колонії з самого початку інкубування формувалися дуже щільними та високими практично в усіх штамів.

Вплив температури на морфологію міцеліальної колонії порівняно зі складом середовища був не таким значним. Штамові особливості і температурний фактор найбільше позначалися на лінійній швидкості росту міцелію, що впливало на величину РК.

Проведені мікроскопічні дослідження культур показали наявність в усіх досліджених штамів характерних для *Sch. commune* мікроструктур на вегетативному міцелії: пряжок, анастомозів, а також екскреторних клітин. Про наявність останніх клітин у досліджуваного виду, а також у деяких представників роду *Pleurotus*, повідомлялося раніше [1, 4]. Вищезгадані мікроструктури досліджувалися у СЕМ й представлені на рисунках 3–5. Медальйонні пряжки з чітким отвором (рис. 4) були наявні як у зоні росту, так і в центральних частинах колонії на всіх досліджених середовищах. У центрі колонії утворювались численні анастомози і навіть відзначено злиття великих ділянок гіф (рис. 5). Екскреторні клітини (рис. 6), здебільшого округлі, розташовані на ніжці, також спостерігали в більшій кількості у гіфах на старіших ділянках колонії.

Висновки

Досліджено ріст і морфогенез 21 штаму вищого базидіального лікарського гриба *Sch. commune* на агаризованих середовищах різного складу при різних температурах. Показано, що склад живильного середовища значно впливав на ріст та морфологію культур. Найкращим середовищем для росту всіх досліджених штамів, крім 1763, було СА. За величиною РК при культивуванні на СА при температурі +20–28 °С більшість досліджених штамів можна віднести до групи грибів, що швидко ростуть (РК>100), а штами 97, 1590, 1713, 1714, 1759, 1760 і 1769 — до групи грибів з середньою швидкістю росту (РК в межах 50–100).

Усі досліджені штами на всіх середовищах росли у широкому температурному інтервалі й не втрачали життєздатності при температурах +4 і +37 °С. Найсприятливішою температурою для росту міцелію більшості штамів була +20 °С, а для штамів 1590, 1713, 1759, 1760 і 5009 — +28 °С. Під час культивування на середовищах СА, КГА та СН при +20–28 °С утворювалися плодові тіла.

Мікроскопічні дослідження методом СЕМ у всіх штамів виявили наявність характерних для *Sch. commune* мікроморфологічних ознак: пряжок, екскреторних клітин та анастомозів. Анастомози та екскреторні клітини частіше спостерігали на старіших ділянках колонії.

1. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. — Киев: Наук. думка, 1988. — 144 с.
2. Ісіков В.П. Ксилотрофні макроміцети Криму // Укр. ботан. журн. — 2003. — 60, № 4. — С. 447 — 463.
3. Методы экспериментальной микологии / Под общ. ред. чл.-кор. АН УССР В.И. Билай. — Киев: Наук. думка. — 1982. — 550 с.
4. Решетников С.В. Эволюция бесполого размножения высших базидиомицетов. — Киев: Наук. думка. — 1991. — 188 с.
5. Hirata A., Iton W., Tabata K. et al. Anticoagulant activity of sulfated schizophyllan // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1994. — 58. — P. 406–407.
6. Hobbs Ch. Medicinal Mushrooms: An exploration of Tradition, Healing and Culture. — Santa Cruz: Botanica Press., 1995. — 251 p.
7. Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. (Ed.) Dictionary of the Fungi. 9th Edition. — Oxon; Wallingford: CAB International, 2001. — 655 p.
8. Lorenzen K., Anke T. Basidiomycetes as a Source for New Bioactive Natural Products // Cur. Organic Chemistry. — 1998. — 2. — P. 329–364.
9. Mizuno T. A Development of Antitumor Polysaccharides from Mushroom Fungi // FFIJ. — 1996. — 167. — P. 69–85.
10. Okamura K., Suzuki M., Chihara T. et al. Clinical evaluation of schizophyllan // Cancer (Philadelphia). — 1986. — 58. — P. 865–872.
11. Sawai M., Adachi Y., Kanai M. et al. Extraction of conformationally stable (1-6)-branched (1-3)- β -glucans from premixed edible mushroom powders by cold alkaline solution // Int. J. Med. Mushr. — 2002. — 4. — P. 197–205.
12. Smith J.E., Sullivan R., Rowan N. The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs: Current perspectives (Review) // Int. J. Med. Mushr. — 2003. — 5. — P. 217–234.

13. Wasser S.P., Sytnik K.M., Buchalo A.S., Solomko E.F. Medicinal Mushrooms: Past, Present and Future // Ukr. Botan. Journ. — 2002. — 59, N 5. — P. 499—524.
14. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: current perspectives (Review) // Int. J. Med. Mushr. — 1999. — 1. — P. 31—62.
15. Yang Q.Y., Jong S.C. Medicinal Mushrooms in China // Mushroom Sci. — 1989. — 12, pt. 1. — P. 631—643.

Рекомендує до друку

Надійшла 16.03.2004

I.O. Дудка

В.М. Линовицкая¹, А.С. Бухало²

¹ Национальный технический университет Украины

«Киевский политехнический институт»

² Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE FR.* (*BASIDIOMYCETES*) НА АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Представлены результаты исследования роста и морфологических особенностей 21 штамма лекарственного гриба *Schizophyllum commune* Fr. из коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины (ИБК), в том числе 13 штаммов, выделенных авторами в разных регионах Украины. Исследования проводили на четырех агаризованных средах при температурах +4, +20, +28 и +37 °С. Для большинства штаммов наиболее благоприятными для роста были сусло-агаровая среда (СА) и температура в интервале +20—28 °С. По величине ростового коэффициента (РК) 67 % штаммов можно отнести к группе быстрорастущих грибов, а 33 % — к группе грибов со средней скоростью роста. На СА и КГА при +20—28 °С часть штаммов образовала премордии на 8—14-е сутки роста. Все исследованные штаммы хорошо росли при температуре +37 °С и не теряли жизнеспособности при температуре +4 °С.

Методом сканирующей электронной микроскопии были изучены характерные для данного вида микроморфологические структуры: пряжки, экскреторные клетки и анастомозы. Анастомозы и экскреторные клетки чаще всего встречались на более старых участках колонии.

V.M. Linovyt'ska¹, A.S. Buchalo²

¹ NTUU «KPI», Faculty of Biotechnology and Biotechnique, Chair of industrial biotechnology

² M.G. Kholodny Institute of Botany National Academy

of Sciences of Ukraine, Department of Mycology, Kyiv

CULTURAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MEDICINAL MUSHROOM *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE FR.* (*BASIDIOMYCETES*) ON AGAR NUTRIENT MEDIA

The growth and morphological features of medicinal mushroom *Schizophyllum commune Fr.* from the Culture collection of Mushrooms (IBK) of the M.G. Kholodny Institute of Botany NASU (Kyiv) were investigated on four agar media at temperatures +4, +20, +28 and +37 °C. The most favorable for the growth of the majority of 21 investigated strains were beer-wort agar and temperature +20—28 °C. 67 % of tested strains can be regarded as fast growing cultures and 33 % may be regarded as ones with average growth rate. The growth rate on potato-glucose agar some strains was as well as on beer-wort agar. The growth of investigated strains was more slow on two tested synthetic media. Primordia were formed in cultures on beer-wort agar and potato-dextrose agar at +20—28 °C on 8-14 days after inoculation. All investigated strains grew well at temperature +37 °C and did not loose their viability at temperature +4 °C.

Micromorphological structures of vegetative mycelium (clamp connections, excretoric cells, anastomoses) were studied using scanning electron microscopy. Anastomoses and excretoric cells were more frequently met in older parts of colony.