

Biological peculiarities of a rare medicinal mushroom *Fomitopsis officinalis* (Fomitopsidaceae, Polyporales) on agar media and plant substrates

O. B. Mykchaylova*, N. A. Bisko*, M. M. Sukhomlyn**, M. L. Lomberg*,
M. V. Pasaylyuk***, Y. V. Petrichuk***, A. P. Gryganskyi****

*M. G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

***Hutsulshchyna National Nature Park, Kosiv, Ukraine

****LF Lambert Spawn Co., Coatesville, USA

Article info

Received 07.09.2017

Received in revised form

20.10.2017

Accepted 23.10.2017

M. G. Kholodny Institute of
Botany, National Academy of
Sciences of Ukraine,
Tereshchenkivska Str., 2, Kyiv,
01601, Ukraine.

E-mail:
mikhajlova.ok@gmail.com

Taras Shevchenko National
University of Kyiv, Ukraine.
Volodymyrs'ka Str., 64, Kyiv,
01033, Ukraine.

E-mail: marsuh@i.ua

Hutsulshchyna National
Nature Park, Kosiv, Ukraine.

E-mail:
masha.pasajlyuk@gmail.com

LF Lambert Spawn Co., 1507
Valley Rd, Coatesville, PA
19320, USA.

E-mail:
andrii.gryganskyi@gmail.com

Mykchaylova, O. B., Bisko, N. A., Sukhomlyn, M. M., Lomberg, M. L., Pasaylyuk, M. V., Petrichuk, Y. V., & Gryganskyi, A. P. (2017). Biological peculiarities of a rare medicinal mushroom *Fomitopsis officinalis* (Fomitopsidaceae, Polyporales) on agar media and plant substrates. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), 469–475. doi:10.15421/021772

Fomitopsis officinalis (Vill.) Bondartsev & Singer is a rare and endangered medicinal mushroom, known in medical practice as agarikon. Strain 5004 of *F. officinalis* from the IBK Mushroom Culture Collection of M. G. Kholodny Institute of Botany was verified using morphological and molecular genetic techniques. DNA analysis shows 99% identity of the investigated strain to other *F. officinalis* sequences deposited in NCBI databases. The results of the study of the biological characteristics of *F. officinalis* 5004 on agar nutrient media and plant substrates of various compositions are presented. We observed the microstructures of *F. officinalis* culture using light and scanning electron microscopy. The hyphae have regular unilateral clamp connections of two types: without a slit and rare medallion-type clamps, some anastomoses and mycelial cords as well as blastoconidia after prolonged cultivation (more than 30 days). The incrustation of the hyphae in the form of thin villi is revealed for the first time. The morphology of the mycelial colonies of *F. officinalis* depended on the composition of the nutrient medium. According to the radial growth rate the culture of investigated species belongs to the fungi growing very slowly within 0.4–1.9 mm/day. The fastest growth of *F. officinalis* 5004 was observed on malt agar with the addition of larch sawdust: 1.8 ± 0.1 mm/day. The critical temperature for mycelial growth was 41 ± 0.1 °C. We tried three variants of plant substrates for fructification: sunflower husk, larch sawdust and larch chips. The substrate composition influenced the vegetative growth and the formation of teleomorph stage. The sunflower husk was the most favorable substrate for the growth of vegetative mycelium. The mycelium had completely colonized this substrate by the 30th day, in contrast to the larch chips, which were only partially colonized (ca. 50%) on 30–40th days of experiment. The fungus developed fruit bodies on both substrates: the sunflower husk and larch chips. The least suitable substrate for vegetative growth of this species was the larch sawdust. After two months of incubation, the mycelium covered only 27% of the visible surface of substrate blocks, with no primordia and fruiting bodies forming. Thus, the obtained mycelium growth parameters on nutrient media, micro- and macromorphological characteristics can be used as additional taxonomic characteristics of *F. officinalis* culture in the vegetative stage of growth. The strain IBK 5004 may become a potential producer for new fungal biotechnologies in Ukraine in the near future.

Keywords: scanning electron microscopy; mycelial colony; radial growth rate; critical temperature; fruiting

Біологічні особливості рідкісного лікарського гриба *Fomitopsis officinalis* (Fomitopsidaceae, Polyporales) на агаризованих живильних середовищах і рослинних субстратах

О. Б. Михайлова*, Н. А. Бісько*, М. М. Сухомлин**, М. Л. Ломберг*,
М. В. Пасайлюк***, Ю. В. Петричук***, А. П. Григанський****

*Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, Київ, Україна

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

***Національний природний парк «Гуцульщина», Косів, Україна

****Компанія «LF Lambert Spawn», Коатсвіль, США

Проведено верифікацію штаму *Fomitopsis officinalis* 5004 з Колекції культур шапинкових грибів (IBK) із застосуванням молекулярно-генетичних і культурально-морфологічних методів дослідження. За результатами ДНК-типуювання рівень гомології штаму становив 99%. Наведено результати дослідження біологічних особливостей штаму на агаризованих живильних середовищах і рослинних субстратах різного складу. Вивчено мікроструктури вегетативного міцелію методами оптичної та сканувальної електронної мікроскопії. У культури *F. officinalis* 5004 спостерігали гіфи з регулярними однобічними пряжками без зазору, дуже рідко пряжки медальйонного типу, незначну кількість анастомозів і міцеліальних тяжів, після тривалого культивування (понад 30 діб) формувалися бластоконодії. Вперше для виду *F. officinalis* виявлено інкрустацію гіф у вигляді тонких ворсинок. За показником радіальної швидкості росту досліджену культуру віднесено до групи грибів, що ростуть дуже повільно. Найсприятливішим для вегетативного росту виявився солодовий агар із додаванням тирси модрині з максимальною швидкістю росту 1,8 мм/добу. З'ясовано критичну температуру для росту вегетативного міцелію штаму *F. officinalis* 5004 – $41 \pm 0,1$ °C. Протестовано рослинні субстрати різного складу для культивування та отримання плодових тіл дослідженого виду у штучних умовах. Найсприятливішим субстратом виявилося лушпиння соняшника, повне обростання якого відбувалося на 30-ту добу експерименту, а формування зачатків плодових тіл починалося з 20-ї доби культивування.

Ключові слова: сканувальна електронна мікроскопія; гіфи; міцеліальна колонія; радіальна швидкість росту; критична температура; плодоношення

Вступ

Fomitopsis officinalis (Vill.) Bondartsev & Singer – рідкісний лікарський гриб, відомий у медичній практиці як «модринова губка». У «Червоній книзі України» *F. officinalis* наводиться під різними назвами: *Boletus officinalis* Vill., *Fomes officinalis* (Vill.) Neum., *Laricifomes officinalis* (Vill.) Kotl. & Pouzar тощо та має природоохоронний статус – «зниклий» (Diduh, 2009). *F. officinalis* – паразит, який розвивається на стовбурах модрині (*Larix sibirica* Ledeb., *L. sukaczewii* Dyl., *L. gmelinii* (Rupr) Rupr., *L. kamchatica* (Rupr) Carr.) і деяких інших видів хвойних, викликаючи бурю кубічну серцевинну гниль. Трапляється у Євразії та Північній Америці. Найбільше його поширення спостерігається у хвойних лісах Красноярського краю, Бурятії, Туви. В Україні ще у першій половині XX століття вид знаходили на території Карпатських і західноукраїнських лісів, проте останнім часом повідомлення про його знахідки відсутні (Diduh, 2009).

Модринова губка – цінний лікарський гриб, який має тривалу історію використання (Wasser, 2010; Chang and Wasser, 2012; Hwang et al., 2013; Grienke et al., 2014; Wasser, 2014; Gabriel, 2016). Сучасні дослідження довели, що модринову губку можна вважати не лише цінною природною сировиною, а і перспективним продуцентом для отримання фармакологічних речовин широкого спектра дії. Із плодових тіл та міцелію *F. officinalis* виділено каротиноїди, стерини, ненасичені жирні кислоти, полісахариди, глюкозаміни, агаріцинову кислоту, біофлавоноїди, вітаміни групи B, E, A, ефірні олії, цитокініни (Oorzhak, 2006; Kovaleva, 2009; Wasser et al., 2011; Cukanova and Belikov, 2013; Vedenicheva et al., 2016). Водні та вуглекислотні екстракти, отримані з плодових тіл *F. officinalis*, мають протимікробну активність до умовно-патогенних бактерій, а також до патогенної бактерії *Mycobacterium tuberculosis* (Ayupova et al., 2009; Chang et al., 2013; Gregori et al., 2013). Діюча речовина, яка забезпечує фармакологічний ефект, – агаріцинова кислота (Gavrilin et al., 2006). Водні екстракти, отримані з міцелію модринової губки, проявляють онкостатичну активність відносно клітин асцитної карциноми Ерліха (АКЕ) (Kovaleva, 2009) та активні стосовно вірусу грипу різних субтипів (H_5N_1 IN = $3,00 \pm 0,11$ lg, H_3N_2 IN = $1,50 \pm 0,25$ lg) (Tepljakova et al., 2014).

Збирання плодових тіл цього гриба разом із неконтрольованим вирубуванням лісів викликали різке скорочення чисельності локалітетів виду (Gregori et al., 2013). Тому сьогодні *F. officinalis* включений до Червоних списків шести європейських країн у категоріях рідкісний (rare), критично рідкісний (extremely rare) чи зникаючий (declining species) та 13 регіонів Російської Федерації (Chlewicki et al., 2003).

Зважаючи на фармакологічну цінність *F. officinalis* та його природоохоронний статус, збереження цього виду – пріоритетне завдання науковців (Hawksworth, 2004; Piętko and Grzywacz, 2005; Gregori et al., 2013). Оскільки на території України у природних умовах вид тривалий час не реєстрували, практичний бік охорони *F. officinalis* нині реалізується шляхом підтримання штамів цього виду в Колекції культур шапинкових грибів (IBK) Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України

(об'єкт національного надбання України) та внесена до міжнародної бази даних Всесвітньої федерації колекцій культур – WFCC (код доступу 1152; www.wfcc.info) (Lomberg et al., 2015; Bisko et al., 2016).

Загалом у базі даних WFCC представлено дев'ять штамів цього виду (<http://gcm.wfcc.info>). Три з них зберігаються в Колекції культур Ботанічного інституту РАН (LE BIN), чотири зазначені в Колекції культур CBS (Тіроль, Австрія), один – у Колекції MUT (П'ємонт, Італія).

Відомості щодо культурально-морфологічних характеристик *F. officinalis* до останнього часу залишалися досить обмеженими. Переважна більшість опублікованих праць присвячена поширенню, екології та охоронному статусу цього виду у природі або дослідженню біохімічного складу та кількісної ідентифікації основних груп біологічно активних речовин у плодових тілах, зібраних у природних умовах. Проте біологічні властивості губки модринової у культурі досліджені фрагментарно. Таким чином, мета цієї статті – встановити культурально-морфологічні особливості штаму *F. officinalis* 5004 на цільних живильних середовищах і рослинних субстратах різного складу. Таке дослідження – важливий етап із погляду збереження цього виду в культурі, відновлення у природному середовищі, пошуку та розроблення біотехнології отримання біологічно активних речовин різноманітного призначення.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – чиста культура *F. officinalis* 5004, яка зберігається у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України (IBK) (Bisko et al., 2016). Видову приналежність культур визначали культурально-морфологічними та молекулярно-генетичними методами. Молекулярно-генетичні дослідження проведені на базі Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного (Київ, Україна) та компанії L. F. Lambert Spawn Co. (Коатсвіль, США). Згідно з установленою практикою, джерелом ДНК у мікологічних дослідженнях виступала чиста аксенічна культура (Kumar and Shukla, 2005). У нашому дослідженні використали 20-добовий вегетативний міцелій штаму *F. officinalis* 5004.

Екстракцію ДНК дослідженої культури здійснювали за модифікованою експрес-методикою, запропонованою Dörnte et al. (2013). Міцеліальну масу вагою 30–50 мг стерильно переносили до пластикової пробірки-епендорфа для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) об'ємом 200 мкл, у яку попередньо вносили 50 мкл стерильного буферного розчину. При цьому намагались уникнути переносу до пробірки агаризованого середовища, тому що його присутність у пробі пригнічує ПЛР. Для приготування буферного розчину в мірну колбу об'ємом 100 мл вносили 10 мл розчину А і 2 мл розчину Б (розчин А: TRIS 1,21 г розчиняли в 10 мл дистильованої води; розчин Б: EDTA 1,46 г розчиняли в 10 мл дистильованої води), доводили до мітки та автоклаували при 0,75 атм. рН розчину становить 8,0.

Готові епендорфи з міцелієм щільно закривали, після чого переносили в мікрохвильову піч на 1 хв за потужності мікрохвилі 1,2 кВт, та нагрівали двічі з перервою в 1,5 хв, щоб

запобігти тепловій деформації пробірок. При цьому ДНК потрапляла у буфер, який, відповідно, являв собою готовий екстракт тотальної ДНК, одержаної з даного зразка. За допомогою піпетки-дозатора 25 мкл надсадової рідини переносили у двох повторях до стерильних 50 мкл пробірок для PCR. Готовий продукт зберігали за температури -20°C до подальшого використання. Надалі заморожені зразки транспортували до молекулярної лабораторії L. F. Lambert Spawn Co. (Коатсвіль, Пенсильванія, США), де були проведені всі подальші молекулярні дослідження.

ПЦР здійснювали в ампліфікаторі T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США), використовуючи стандартний протокол для ділянок внутрішнього транскрибувального спейсера (ITS) у грибів (Kumar and Shukla, 2005). Для підтвердження успішності ампліфікації здійснювали гель-електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в 1% агарозному гелі на основі буферу 1xSB (борат натрію, Faster Better Media LLC, Хант Велей, США) за напруги 120 В у PowerPac TM Basic (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США). Візуалізацію продуктів ПЦР проводили в транс-ілюмінаторі Universal Hood 75S (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США). Ампліфікований продукт PCR очищали від залишків полімеразної суміші за допомогою криветкової лужної фосфатази (GE Healthcare, Принстон, США) – 0,1 одиниці, та екзонуклеази I (New England Biolabs, Іпсвіч, США) – 0,23 одиниці на один зразок відповідно. Для визначення нуклеотидних послідовностей досліджуваного фрагмента геному очищені продукти ПЦР секвенували методом Сенгера з використанням праймера ITS4 у PrimBio Research Institute (Екстон, США). Послідовності відредаговані та вирівняні з використанням програмного пакета Geneious v. 8.1.8 (Biomatters LTD, Окленд, Нова Зеландія).

Верифікацію штаму 5004 проводили на основі нуклеотидної послідовності генів рДНК (ITS1-5,8S-ITS2), аналізуючи отримані дані в програмі MEGA 6. Для пошуку близько споріднених послідовностей використовували евристичний алгоритм на сервері BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), який дозволяє визначати гомологічні послідовності у доступній міжнародній базі даних нуклеїнових кислот (NCBI) Національного Центру біотехнологічної інформації Національного інституту Здор'я США GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Морфологію та зростання культури досліджували на стандартних і модифікованих агаризованих живильних середовищах різного складу: 1) мальц екстракт агар (MEA); 2) солодовий агар (8° по Балінгу) з додаванням 1% тирси модрини (CAM); 3) солодовий агар (8° за Балінгом) з додаванням 1% тирси вишні (CAB); 4) картопляно-декстрозний агар (DIFCO) (КДА); 5) глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА), г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 5,0; дріжджовий екстракт – 3,0; агар-агар – 20, рН 5,5. Як посівний матеріал використані 14-добові культури, вирощені на САМ. Диски міцелію діаметром 5 мм вирізали стерильною сталлюю трубкою по краю (до 10 мм) активно ростучої колонії, переносили їх у центр чашки Петрі із зазначеними вище середовищами та інкубували в термостаті за $26 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Визначення впливу екстремальних значень температури на життєздатність дослідженої культури *F. officinalis* проводили у пробірках зі скошеним середовищем САМ за температур $30\text{--}42^{\circ}\text{C}$ із кроком $1 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Після третьої доби інкубації враховували наявність чи відсутність росту міцелію. Пробірки, на яких ріст міцелію не спостерігали, далі інкубували за температури $26 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Поновлення росту або втрату життєздатності міцелію культури фіксували після 10 діб інкубації. Радіальну швидкість росту розраховували за методикою (Solomko et al., 2000; Lomberg and Solomko, 2012). Мікро- та макроморфологічні особливості міцелію визначали на чотириптижневих колоніях за стандартними методиками, запропонованими П. Сталперсом (Stalpers, 1978). Макроморфологічна характеристика колонії включала в себе опис текстури міцеліальної колонії та її колір, запах міцелію, колір реверзumu, мікроморфологічна – опис характерних особливостей гіфальної системи,

наявність на міцелії пражок і анаморф. Мікроструктури вегетативного міцелію досліджували у світловому мікроскопі марки МБІ-6 та сканувальному електронному мікроскопі JSM-35С (Японія), використовуючи модифікований метод Е. Квательбаума і Г. Карнера (Buhalo et al., 2011).

Динаміку росту вегетативного міцелію *F. officinalis* на різних субстратах різного складу досліджували в лабораторії екологічного моніторингу НПП «Гуцульщина». Використано такі субстрати: 1) модринова стружка; 2) модринова тирса; 3) лушпиння соняшника. Модринову стружку отримували у процесі стругання здорової модринової деревини, розміри дерев'яних частинок складали $10 \times 10\text{--}40 \times 1$ мм. Модринову тирсу отримували під час розпилювання здорової модринової деревини, розміри дерев'яних частинок $1\text{--}2$ мм (надання модринового матеріалу для досліджень погоджено Науково-технічною радою НПП «Гуцульщина» від 23.12.2015 р.).

Усі субстрати зволожували до 60% вологості та розкладали в 1 л колби. Кожна колба містила $40 \pm 1,5$ г зволоженого субстрату. Ємності з усіма варіантами субстратів автоклаували 90 хв за двох атмосфер.

Колби із субстратами стерильно інокулювали посівним міцелієм 25-денного віку, вирощеним на САМ при $26 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. У кожену колбу вносили 1/4 частини колонії міцелію з чашки Петрі, діаметром 90 мм. Посіви інкубували за температури $26 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Щодня візуально контролювали та реєстрували ступінь обростання субстрату міцелієм культури. Для цього лінійкою вимірювали висоту субстрату, який обріс міцелієм із чотирьох взаємно перпендикулярних боків ємності. Обчислювали середні значення та визначали (у %) висоту оброслого міцелієм субстрату.

Всі досліди проводили у трьох біологічних повторностях. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).

Результати

Штам *F. officinalis* 5004 зберігається у Колекції культур шапинкових грибів (ІБК) понад 35 років (Bisko et al., 2016). Підтвердження його таксономічного статусу необхідне для проведення подальших досліджень цієї культури. Підтвердження видової приналежності *F. officinalis* 5004 проведено із застосуванням молекулярно-генетичних і культурально-морфологічних методів дослідження.

Для штаму *F. officinalis* 5004 проведено повне визначення нуклеотидних послідовностей внутрішнього транскрипційного спейсера: ITS1, 5.8S та ITS2 регіонів рНК, а також часткове визначення 18S та 28S послідовностей, що оточують ITS. У результаті пошуку в генбанку депоновані там послідовності зразків *F. officinalis* показали 99% ідентичності з отриманими нами послідовностями, підтвердивши тим самим вид дослідженого штаму. Найближчий штам із бази даних NCBI до досліджуваної нами культури *F. officinalis* 5004 (код доступу MF952886) – ізолят ОКМ-8050 *Fomitopsis officinalis* (код доступу KC585355.1).

Додаткову верифікацію штаму *F. officinalis* 5004 проведено класичними морфолого-культуральними ознаками: досліджено мікро- та макроморфологію вегетативного міцелію за сукупністю ознак на стандартному живильному середовищі за традиційною класифікацією Stalpers (1978), ростові показники (радіальна швидкість росту), відношення до температури, наявність генеративної стадії на певних живильних середовищах.

У результаті проведеного дослідження мікроморфології за допомогою світлового та сканувального електронного мікроскопів встановлено, що вегетативний міцелій *F. officinalis* 5004 складається переважно з тонкостінних, помірно розгалужених, регулярно септованих, незабарвлених генеративних гіф діаметром $1,2\text{--}3,5$ мкм. На гіфах утворювались численні, поодинокі пражки без зазору (рис. 1), дуже рідко пражки медальйонного типу, незначна кількість анастомозів та міцеліальних тяжів.

Крім того, вперше для *F. officinalis* спостерігали інкрустацію гіф у вигляді тонких ворсинок. Після тривалого культивування понад 30 діб на вегетативному міцелії формувались товстостінні бластоконідії еліпсоїдної форми.

У результаті проведених досліджень на агаризованих живильних середовищах різного складу виявлено мінливість морфологічних ознак міцеліальних колоній *F. officinalis* залежно від складу середовищ. Формувались два основні типи колоній.

1. Колонії дуже щільні, непрозорі, повстисті, рідше оксамитові, білого кольору зі значною кількістю коротких повітряних гіф. Край колонії нерівний, злегка піднятий над субстратом, запах відсутній або слабо фруктовый. Колір реверзума збігається із кольором середовища.

2. Колонії розріджені, шерстисті або борошністі, край нерівний, злегка піднятий над субстратом, запах відсутній. Забарвлення реверзума не спостерігали.

Висота та щільність колоній варіювали залежно від складу живильного середовища. Найсприятливішим для росту виявилось середовище САМ, до складу якого входила тирса модрини. На ньому формувались колонії першого типу (рис. 2а). На середовищі ГПДА хоча і спостерігали колонії першого типу, проте їх розміри навіть на 30-ту добу культивування не перевищували 30 мм у діаметрі (рис. 2б). Колонії другого типу формувались на МЕА та КДА (рис. 3а). На всіх використаних середовищах із віком з'являлись краплі ексудату та пігментація коричневого кольору (рис. 3б).

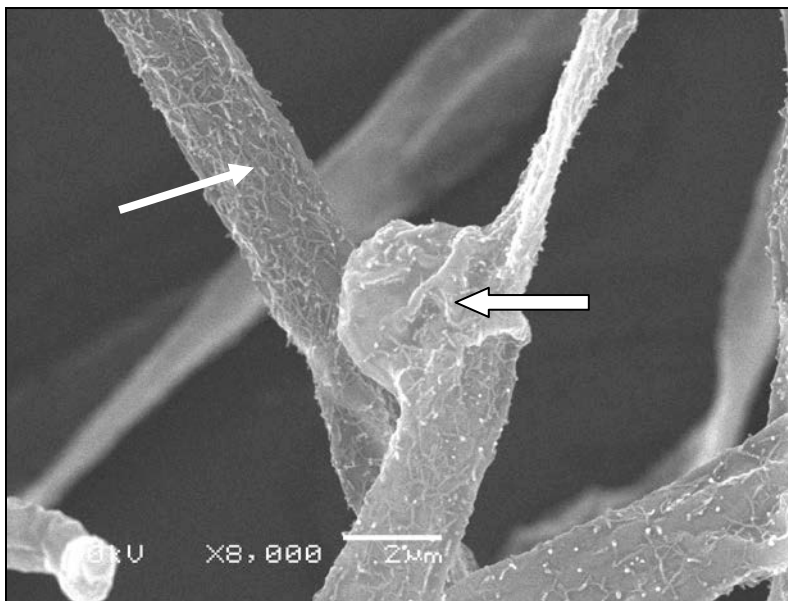


Рис. 1. *Fomitopsis officinalis* 5004: пряжка на гіфі без зазору, інкрустація гіф

Визначено швидкість радіального росту на агаризованих живильних середовищах різного складу, встановлено залежність цього показника від складу поживних речовин (рис. 4).

Культура *F. officinalis* 5004 характеризується низькою швидкістю радіального росту та вимогливістю до складу живильних середовищ. Для дослідженого штаму максимальну швидкість росту забезпечував солодовий екстракт із додаванням тирси модрини (1,9 мм/добу). На решті живильних середовищ швидкість радіального росту реєстрували в межах 0,4–1,0 мм/добу. За швидкістю радіального росту *F. officinalis* можна віднести до групи грибів, які ростуть дуже повільно (менше 2 мм/добу).

Досліджено вплив критичних температур на ріст і життєздатність вегетативного міцелію. Культура *F. officinalis* 5004 за підвищення температури інкубації до $37 \pm 0,1$ °C не росла, проте не втрачала своєї життєздатності та відновлювала ріст під час перенесення її за умов $26 \pm 0,1$ °C протягом тижня. Температура $41 \pm 0,1$ °C з експозицією три доби виявилась критичною для росту вегетативного міцелію.

Вплив складу субстратів на ріст вегетативного міцелію та формування стадії телеоморфи досліджували на трьох варіантах рослинних субстратів: лушпиння соняшника, модринова тирса та модринова стружка.

Аналіз отриманих результатів дав змогу встановити певні показники та визначити специфіку росту культури *F. officinalis* 5004 на субстратах різного складу. Найсприятливішим субстратом для росту вегетативного міцелію виявилось лушпиння соняшника, на 30-ту добу експерименту спостерігали повне обростання субстрату, на відміну від модринової тирси та модринової стружки, які повністю не заростали. Відсоток обростання модринової стружки міцелієм *F. officinalis* на 30–40-ву добу експерименту складав 50%. Найнижчий відсоток оброс-

тання (27%) характерний для модринової тирси: показники виходили на плато на 20-ту добу експерименту та залишалися такими навіть на 60-ту добу від дати внесення міцелію у субстрат (рис. 5).

Формування зачатків плодових тіл спостерігали лише на двох субстратах – лушпинні соняшника та модриновій стружці. На лушпинні соняшника примордії формувалися після 20-ї доби культивування, вони були молочно-кремового кольору, покривали субстрат щільним товстим шаром (рис. 6).

На модриновій стружці поодинокі зачатки плодових тіл починали формуватись на 30-ту добу культивування. На противагу плодовим тілам, сформованим на лушпинні соняшника, плодові тіла, сформовані на модриновій стружці, були сніжно-білими, їх краї мали зірчастоподібний вигляд (рис. 7). Таким чином, формування зачатків плодових тіл спостерігали лише на лушпинні соняшника та модриновій стружці. Модринова тирса – малоприсадожливий субстрат для обростання міцелієм *F. officinalis* 5004 та непридатна для формування зачатків плодових тіл гриба.

Обговорення

Під час роботи з культурами макроміцетів необхідно постійно контролювати їх чистоту за встановленими мікро- та макроморфологічними ознаками певного виду (Nobles, 1971). Одна з найважливіших таксономічних ознак під час ідентифікації базидієвих макроміцетів у культурі – наявність унікальної структури – пряжок, які утворюються на міцелії багатьох представників цієї групи грибів (Stalpers, 1978). Різні види характеризуються певними відмінностями в розташуванні пряжок на міцелії, частоті їх утворення, розмірах тощо (Buchalo et al., 2011; Volz and Nevo, 2009). Для даного виду встановлено два типи пряжок: класичні та медальйонні.

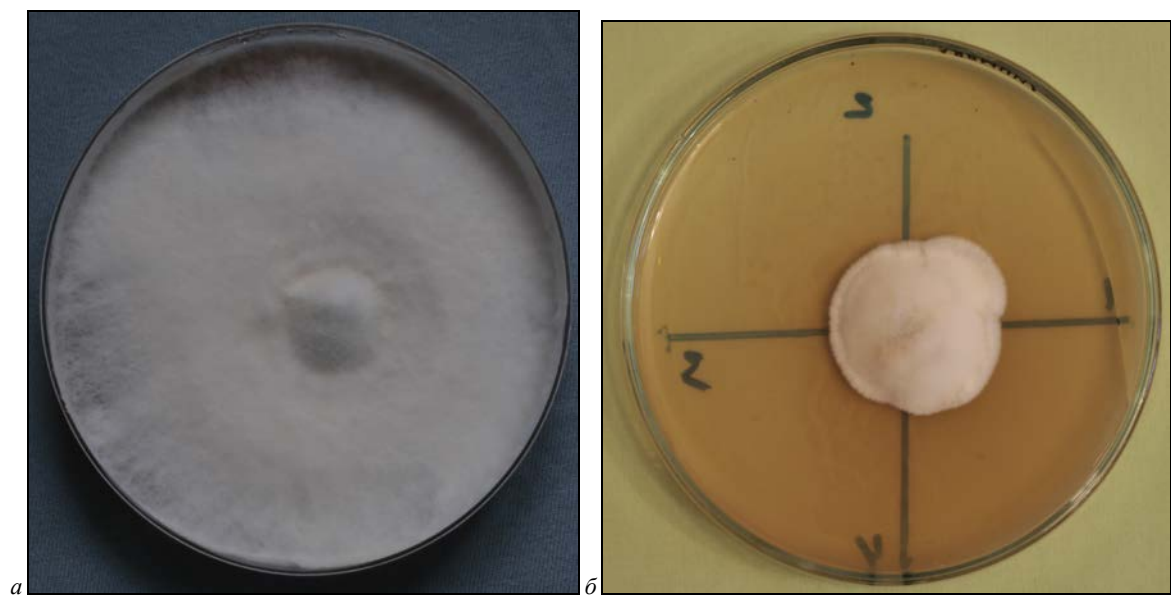


Рис. 2. Міцеліальні колонії *Fomitopsis officinalis* 5004 на агаризованому живильному середовищі САМ (а) і ГПДА (б) за температури інкубації $26 \pm 0,1$ °C (30-та доба культивування)



Рис. 3. Міцеліальні колонії *Fomitopsis officinalis* 5004: а – на агаризованому живильному середовищі МЕА (30-та доба культивування); б – на агаризованому живильному середовищі САМ (60-та доба культивування); температура інкубації $26 \pm 0,1$ °C

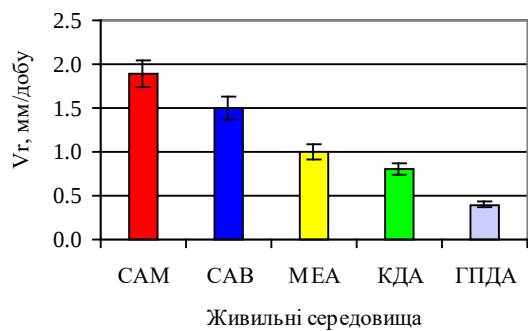


Рис. 4. Радіальна швидкість росту колоній *F. officinalis* 5004 на агаризованих живильних середовищах різного складу за температури $26 \pm 0,1$ °C

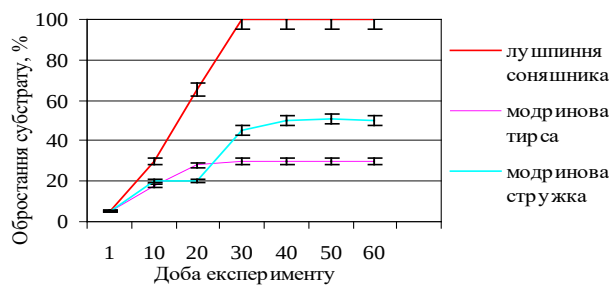


Рис. 5. Динаміка обростання міцелієм *F. officinalis* 5004 субстратів різного складу



Рис. 6. Зачатки плодових тіл *Fomitopsis officinalis* 5004 на лушпинні соняшника, 20-та доба експерименту



Рис. 7. Зачатки плодових тіл *Fomitopsis officinalis* 5004 на модриновій стружці, 30-та доба експерименту

У літературі наводяться дані (Kovaleva, 2009), що модринова губка після 30 діб культивування здатна утворювати незначну кількість бластоконідій. Отримані нами мікроморфологічні характеристики *F. officinalis* 5004 важливі для ідентифікації та контролю чистоти культури під час збереження штаму в умовах колекції. Всі досліджені живильні середовища придатні для росту міцелію гриба, проте додавання тирси модрини позитивно впливало на ростові показники культури. Наші результати повністю узгоджуються з даними, наведеними іншими дослідниками. Kovaleva (2009) наводить дані щодо значень середньодобової швидкості росту ізолятів *F. officinalis* у межах від 0,75 до 0,96 мм/добу та значенням ростового коефіцієнта в межах 24,5–25,6 на сусло-агарі та сусло-агарі з додаванням 1–3% тирси модрини. Автор пропонує культивувати штами *F. officinalis* на сусло-агарі з додаванням 1% тирси модрини.

Нині ще не розроблено ефективної технології штучного отримання плодових тіл *F. officinalis*. Одна з причин відсутності технології – недосконале знання біологічних особливостей цього виду, тому проведення досліджень у напрямку наукового обґрунтування основних етапів культивування доцільне. Використання модринової тирси та модринової стружки як субстратів для нарощування посівного інокуляту *F. officinalis* видається доцільним з огляду на субстратну приуроченість гриба. Однак їх використання виявилось менш успішним, ніж лушпиння соняшника, яке повністю обростало міцелієм гриба на 30-ту добу експерименту, тоді як відсоток обростання модринової стружки та тирси не перевищував 50% і 27% відповідно. Очевидно, що тирса та стружка модрини – бідні за вміс-

том поживних речовин середовища, на відміну від соняшникового лушпиння. З огляду на отримані результати, під час подальших експериментів із використанням тирси та стружки модрини доцільно додавати до цих субстратів різні домішки. Результати дослідження Kovaleva (2009) свідчать про необхідність для росту модринової губки у рослинному субстраті 60% лігніну, 20% деревної зелені ялиці та 20% кори ялиці.

Зважаючи на те, що в Україні цінний лікарський гриб *F. officinalis* вважається зниклим, отримані нами дані (склад живильних середовищ і рослинних субстратів, параметри росту міцелію, критична температура інкубації) створюють наукові засади технології культивування цього виду, а також у подальшому можуть бути використані для реінтродукції його в природні умови.

Висновки

Проведено верифікацію штаму *F. officinalis* 5004 із застосуванням молекулярно-генетичних і культурально-морфологічних методів дослідження. Видова належність штаму, визначена за морфологічними ознаками, повністю збіглася з результатами ДНК-типування, ідентичність до послідовностей інших ізолятів та колекційних зразків *F. officinalis* становить 99%. Отримано дані про ріст і морфологію міцеліальних колоній *F. officinalis* 5004 на живильних агаризованих середовищах і рослинних субстратах різного складу. За швидкістю росту досліджену культуру *F. officinalis* 5004 віднесено до групи грибів, що ростуть дуже повільно (0,4–1,9 мм/добу). Підібрано

склад середовища (солодовий агар із додаванням тирси модри-ни) для культивування та збереження штамів у належному фізіологічному стані в умовах колекції. Встановлено критичну для життєздатності міцелію *F. officinalis* температуру – $41 \pm 0,1$ °C. Визначено мікро- та макроморфологічні характеристики міцелію на певних середовищах, ростові показники, які можна використовувати як додаткові таксономічні характеристики культур *F. officinalis* у вегетативній стадії росту. Проведено випробування рослинних субстратів різного складу для культивування міцелію та отримання плодових тіл *F. officinalis* у штучних умовах. Найсприятливішим субстратом для росту вегетативного міцелію та формування зачатків плодових тіл *F. officinalis* 5004 виявилось лушпиння соняшника.

Автори щиро вдячні В. І. Сапсаю за проведені дослідження мікроструктур вегетативного міцелію під сканувальним електронним мікроскопом.

References

- Bisko, N. A., Lomberg, M. L., Mytropolska, N. Y., & Mykchaylova, O. B. (2016). The IBK mushroom culture collection. Alterpres, Kyiv.
- Buchalo, A. S., Wasser, S. P., Mykchaylova, O. B., Bilay, V. T., & Lomberg, M. L. (2011). Taxonomical significance of microstructures in pure cultures of macromycetes. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), 10, 50–57.
- Chang, H., Birgit, J., Larry, K., McAlpine, L. D., Napolitano, J., Fryling, J., Franzblau, N., Sang, S. C., Stamets, H., Wang, P., & Guido, Y. P. (2013). Chlorinated coumarins from the polypore mushroom *Fomitopsis officinalis* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Natural Products, 76(10), 1–13.
- Chang, S. T., & Wasser, S. P. (2012). The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. International Journal of Medicinal Mushrooms, 95(1), 95–134.
- Chlebicki, A., Mukhin, V., & Ushakova, N. (2003). *Fomitopsis officinalis* on Siberian Larch in the Urals. Mycologist, 17(3), 1–6.
- Cukanova, P. A., & Belikov, V. G. (2013). Issledovanie himicheskogo sostava i standartizacija syr'ja listvennichnoj gubki [Investigation of the chemical composition and standardization of raw larch sponge]. Razrabotka, Issledovanie i Marketing Novoj Famacevicheskoy Produktii, 68, 130–132 (in Russian).
- Diduh, J. P. (Ed.). (2009). Chervona knyha Ukraïny. Roslynnyj svit [Red Data Book of Ukraine. Vegetable Kingdom]. Globalkonsalting, Kyiv (in Ukrainian).
- Dömte, B., & Kües, U. (2013). Fast microwave-based DNA extraction from vegetative mycelium and fruiting body tissues of Agaricomycetes for PCR amplification. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 7(4), 825–836.
- Gabriel, J. (Ed.). (2016). Macromycetes: Medicinal properties and biological peculiarities. [Makromicety: Lekarstvennye svoystva i biologicheskie osobennosti]. Vol. 2. Nash Format, Kyiv (in Russian).
- Gavrilin, M. V., Belikov, V. G., Ajrapetova, A. J., & Cukatova, P. A. (2006). Identifikacija agaricinovoj kisloty metodom infrakrasnoj spektroskopii [Identification of agaric acid by infrared spectroscopy]. Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Serija: Himija, Biologija, Farmacija, 2, 231–232 (in Russian).
- Grienke, U., Zöll, M., Peintner, U., & Rollinger, J. M. (2014). European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. Journal of Ethnopharmacology, 154(3), 564–583.
- Hawksworth, D. L. (2004). Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. Studies in Mycology, 50, 9–18.
- Hwang, C. H., Jaki, B. U., Klein, L. L., Lankin, D. C., McAlpine, J. B., & Napolitano, J. G. (2013). Chlorinated coumarins from the polypore mushroom *Fomitopsis officinalis* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Natural Products, 76(10), 1916–1923.
- Kovaleva, G. K. (2009). Biologicheskie osobennosti i biohimicheskij sostav ksilotrofnih bazidiomicetov *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. i *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat. [Biological features and biochemical composition of xylotrophic basidiomycetes *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. and *Trametes versicolor* (L.: Fr.)]. Moscow (in Russian).
- Kumar, M., & Shukla, P. K. (2005). Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. Journal of Clinical Microbiology, 43(2), 662–668.
- Lomberg, M. L., & Solomko, E. F. (2012). Rost kul'tur makromicetov na agarizovannyh pitatel'nyh sredah i plotnyh substratah [Growth of the macromycetes cultures on agar nutrient media and solid substrates]. In: Wasser, S. P. (ed.), Biological features of medicinal macromycetes in culture. Vol. 2. Alterpres, Kyiv, 345–371 (in Russian).
- Lomberg, M. L., Mykchaylova, O. B., & Bisko, N. A. (2015). Kolekcija kul'tur shapynkovykh grybiv (IBK) jak ob'jekt nacional'nogo nadbannja [Mushroom culture collection (IBK) as a subject of national heritage of Ukraine]. Ukrainian Botany Magazine, 72(1), 22–28 (in Ukrainian).
- Nobles, M. K. (1971). Cultural characters as a guide to the taxonomy of Polyporaceae. International Symposium Evolution in Higher Basidiomycetes. University of Tennessee Press, Knoxville.
- Oorzhak, U. S. (2006). Nauchno-prakticheskie aspekty racional'nogo ispol'zovanija plodovykh tel *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing. [Scientific and practical aspects of the rational use of fruit bodies of *Fomitopsis officinalis*]. Krasnojarsk (in Russian).
- Piętka, J., & Grzywacz, A. (2005). In situ inoculation of larch with the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis officinalis* (Basidiomycota) experimental studies. Polish Botanical Journal, 50(2), 225–231.
- Solomko, E. F., Lomberg, M. L., & Mytropolska, N. J. (2000). Rist okremykh vydiv likars'kyh makromicetiv na zhyvyj nyh sereodovyshhah riznogo skladu [Growth of some species of medicinal macromycetes on nutrient media of different composition]. Ukrainian Botany Magazine, 57(2), 119–126 (in Ukrainian).
- Stalpers, J. A. (1978). Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. Studies in Mycology, 16, 1–248.
- Tepljakova, T. V., Kosogova, T. A., Anan'ko, G. G., Bardasheva, A. V., & Il'icheva, T. N. (2014). Protivovirusnaja aktivnost' bazidial'nyh gribov. Obzor literatury [Antiviral activity of basidiomycetes. Review of literature]. Problemy Medicinskoj Mikologii, 16(2), 15–25 (in Russian).
- Vedenicheva, N. P., Al-Maali, G. A., Mytropolska, N. Y., Mykchaylova, O. B., Bisko, N. A., & Kosakivska, I. V. (2016). Endogenous cytokinins in medicinal Basidiomycetes mycelia biomass. Biotechnologia Acta, 9(1), 55–63.
- Volz, P. A., & Nevo, E. (Eds.). (2009). Microstructures of vegetative mycelium of macromycetes in pure cultures. Alterpres, Kyiv.
- Wasser, S. P. (2010). Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems. International Journal of Medicinal Mushrooms, 12, 1–16.
- Wasser, S. P. (2014). Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. Biomedical Journal, 37(6), 345–356.
- Wasser, S. P. (Ed.). (2011). Biologicheskie osobennosti lekarstvennykh makromicetov v kul'ture [Biological features of medicinal macromycetes in culture]. Vol. 1. Alterpres, Kyiv (in Russian).
- Wasser, S. P. (Ed.). (2012). Biologicheskie osobennosti lekarstvennykh makromicetov v kul'ture [Biological features of medicinal macromycetes in culture]. Vol. 2. Alterpres, Kyiv (in Russian).