М И К О Л О Г И Я И Ф И Т О П А Т О Л О Г И Я

Том 43 2009 Вып. 1

УДК 581.524.1 : 635.8

© *Д. Н. Савельева, О. В. Камзолкина*

СОВМЕСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *PLEUROTUS* С ЭПИФИТНЫМИ ДРОЖЖАМИ

SAVELIEVA D. N., KAMZOLKINA O. V. CULTIVATION OF SOME SPECIES FROM GENUS *PLEUROTUS* WITH EPIPHYTIC YEASTS

Эпифитные дрожжи широко распространены в природе на поверхности стеблей, листьев, плодов и ягод травянистых и древесных растений. Они не участвуют непосредственно в процессе разложения древесины, так как не имеют необходимых гидролитических ферментов, однако могут стимулировать рост мицелиальных грибов-ксилотрофов и служить для них дополнительным источником питания (Hutchison, Barron, 1996). Паразитизм грибов на дрожжевых клетках, а также на бактериях и одноклеточных водорослях детально описан на примере устричной вешенки *Pleurotus ostreatus* (Barron, 1988; Hutchison, Barron, 1996, 1997). Главным лимитирующим фактором для развития ксилотрофных грибов является недостаток азота в древесине, поэтому считается, что клетки микроорганизмов служат для гриба дополнительным источником в первую очередь азота (Barron, 1988).

Все виды рода *Pleurotus* — ксилотрофные грибы. Они обитают на мертвой или живой ослабленной древесине хвойных и лиственных пород деревьев, вызывая белую гниль, т. е. разрушают как целлюлозу, так и лигнин древесины. Большинство видов вешенки обладает высокой скоростью роста и успешно культивируются на различных питательных средах в лабораторных условиях, что делает эти виды удобным объектом для изучения макро- и микроморфологических признаков гриба в условиях чистых культур.

Грибы рода *Pleurotus* широко распространены в природе, они являются ценным объектом для пищевой и парфюмерной промышленности, медицины и фармакологии. Как виды-космополиты — легочная и устричная, так и экзотические — розовая и лимонношляпковая вешенки культивируются в искусственных условиях в промышленных масштабах. Плодовые тела грибов ценятся не только по вкусовым качествам, но и за содержание биологически активных веществ, обладающих противомикробным, противоопухолевым, гиполипидемическим и другими свойствами (Lindequist et al., 2005). В связи с этим виды рода *Pleurotus* культивируются не только в пищевых целях, но и как объекты для медицинских исследований.

Вешенка лимонношляпковая — *P. citrinopileatus* Singer — субтропический вид, распространен в странах Юго-Восточной Азии, на юге Японии, в Китае, а также в Дальневосточном регионе России. Гриб произрастает на валеже широколиственных деревьев, таких как дуб, вяз, бук. Плодовые тела «золотого устричного гриба» ценятся не только за эффектную лимонную окраску и приятный ореховый запах, но и за свои медицинские свойства (например, экстракты из плодовых тел обладают гиполипидемическим действием).

Розовая вешенка — *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn — распространена в зоне тропиков и субтропиков, встречается на древесине пальмы, гевеи и бамбука (Sta-

mets, 2000). Гриб уступает по вкусовым качествам другим видам рода, но высоко ценится в кулинарии за необычный ярко-розовый цвет плодовых тел.

Королевская вешенка, или степной белый гриб, — *Pleurotus eryngii* (DC.) Gillet — растет на погребенных корнях и в основании отмерших стеблей зонтичных растений в степной зоне России, а также на юге Европы, в Северной Африке и в Центральной Азии. Название вида происходит от родового названия одного из «хозяев» гриба — синеголовника (род *Eryngium*). Королевская вешенка съедобна и широко культивируется в искусственных условиях, а также является продуцентом биологически активных веществ (например, гемолизина, ловастатина и др.).

Вешенка легочная — *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. — космополит, один их самых распространенных видов рода. Гриб обитает на мертвой древесине хвойных и лиственных пород деревьев; в искусственных условиях неприхотлив, широко культивируется по всему миру. Экстракты из мицелия и плодовых тел вешенки легочной содержат различные биологически активные вещества, обладающие антиоксидантным, противовоспалительным и онкостатическим свойствами (Joes et al., 2002).

Свойство грибов вступать в ассоциации с микроорганизмами открывает перспективу использования совместных культур грибов и микроорганизмов в промышленном грибоводстве, а также в процессе получения биологически активных веществ. Изучение ассоциаций грибов с микроорганизмами, таким образом, представляет как научный, так и практический интерес.

Ранее были описаны механизмы взаимодействия мицелия *P. ostreatus* и *P. pulmonarius* и клеток дрожжей (Камзолкина и др., 2006). Целью настоящей работы было исследование морфолого-культуральных признаков совместных культур *P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. pulmonarius* и нескольких видов эпифитных дрожжей из разных систематических групп в лабораторных условиях и в процессе плодообразования.

Материал и методы

В опытах использовали штаммы четырех видов рода *Pleurotus*: 1) *P. citrinopileatus* Singer, сортовой штамм Santana 304P; 2) *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, сортовой штамм Santana RP; 3) *P. eryngii* (DC.) Gillet, сортовой штамм CP; 4) *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. БФ-32, природный изолят.

Проведено совместное культивирование вешенки с тремя видами базидиальных эпифитных дрожжей: *Cryptococcus albidus* (Saito) C. E. Skinner, *Cystofilobasidium capitatum* (Fell, I. L. Hunter et Tallman) Oberw. et Bandoni, *Rhodotorula minuta* (Saito) F. C. Harrison, — и тремя видами сумчатых эпифитных дрожжей: *Hanseniaspora uvarum* (Niehaus) Shehata, Mrak et Phaff, *Metschnikowia pulcherrima* Pitt. et M. W. Mill., *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen (штаммы 3785 и 3809).

Микроорганизмы культивировали в чашках Петри раздельно и совместно на 1.5%-м голодном агаре. Чашки Петри инкубировали в термостате при 25 ± 1 °С. Мицелий гриба инокулировали в центр чашки Петри на поверхность среды. Через 7 суток роста на поверхность среды наносили каплю (50 мкл) водной суспензии дрожжей (концентрация клеток 10^6 в 1 мл), выращенных на скошенном сусло-агаре (2.4 °Б), в трех местах на расстоянии 1.5—2 см от края колонии гриба. Совместные культуры вешенки и дрожжей инкубировали в термостате еще 3—4 суток. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Морфологию совместных культур исследовали визуально, а также при помощи светового микроскопа Axioskop 40FL. Наблюдение за микроморфологией монокультур и совместных культур микроорганизмов проводили на 3-и—4-е сутки совместного роста. Для приготовления препаратов в зоне контакта мицелия и колонии дрожжей вырезали блок агара и помещали его в каплю воды на предметное стекло. Препараты микроскопировали при увеличениях 40 и 100; микрофотографии были получены с помощью цифровой камеры AxioCam MRc (Zeiss).

В опытах по выгонке плодовых тел грибов использовали два вида вешенки: *Pleurotus citrinopileatus* и *P. djamor* — и два вида дрожжей: *Hanseniaspora uvarum* и *Saccharomyces cerevisiae*. Посевной мицелий грибов выращивали на пшеничном зерне. Зерно отваривали, смешивали с мелом (3 %), помещали в колбы Эрленмейера и автоклавировали в режиме 1 атм./30 мин. Блок агара с мицелием гриба переносили в колбу с помощью посевной иглы. Колбы инкубировали в термостате при температуре 24 ± 1 °С. В качестве субстрата для культивирования использовали подсолнечную лузгу, которую замачивали в кипятке на 1 ч, затем помещали в стеклянные банки объемом 450 мл и автоклавировали дважды в режиме 1 атм./30 мин. Заращивание субстрата производили в термостате при температуре 24 ± 1 °С. Выгонку плодовых тел осуществляли во влажной камере при температуре 22.5 °С и относительной влажности воздуха 95 %.

Водную суспензию дрожжей (концентрация клеток 10^6 в 1 мл), выращенных на скошенном сусло-агаре (2.4 °Б), вносили в субстрат на 4-е сутки после его инокуляции мицелием в количестве 5 мл на одну банку. В качестве контроля использовали субстрат без добавления суспензии. Все эксперименты проводили в трех повторностях. В работе приведены данные первой волны плодоношения.

Результаты и обсуждение

На 3-и—4-е сутки совместного роста на голодном агаре мицелий гриба полностью зарастал микроколонии дрожжей на поверхности среды. Присутствие дрожжей не ингибировало и не ускоряло роста мицелия четырех исследованных видов вешенки.

В монокультурах вешенки на голодной среде воздушный мицелий был развит слабо и основная масса гиф была погружена в субстрат. В совместных культурах в зонах контакта с дрожжевыми колониями был хорошо развит воздушный мицелий.

Гифы мицелия были частично инкрустированы различной формы кристаллами как в монокультурах, так и в совместных культурах. Мицелий грибов в монокультурах был инкрустирован преимущественно мелкими шаровидными кристаллами; в совместных культурах гифы были инкрустированы мелкими шаровидными, игольчатыми и палочковидными, а также крупными прямоугольными кристаллами.

В монокультурах четырех видов вешенки на поверхности среды были обнаружены единичные крупные кристаллы прямоугольной или октаэдрической формы. В совместных культурах наблюдалась тенденция к увеличению количества кристаллов на поверхности среды. Наибольшее количество кристаллов было обнаружено в совместных культурах грибов с *Metschnikowia pulcherrima* и *Saccharomyces cerevisiae.* По-видимому, присутствие дрожжей влияет на метаболизм клеток мицелия и вызывает усиленное образование кристаллов.

Было отмечено, что в совместных культурах частота ветвления гиф мицелия в зоне контакта с колониями дрожжей увеличивалась в среднем в 2—4 раза, о чем свидетельствовало уменьшение расстояния между соседними боковыми веточками одной гифы вблизи апикального кончика (в среднем от 40—80 до 15—40 мкм). Учащение ветвления гиф мицелия может свидетельствовать об увеличении поверхности контакта мицелия с дрожжевыми колониями.

Наиболее характерным признаком изменения микроморфологии мицелия в присутствии микроорганизмов считается наличие на гифах сосочковидных выростов, образующихся для формирования контакта и проникновения внутрь дрожжевых клеток (Камзолкина и др., 2006). Это короткие выросты гиф: 0.5—5 мкм в дл., 1—2 мкм в шир. в основании, — расположенные по одному или несколько на одну клетку гифы (рис. 1). Было обнаружено появление сосочковидных выростов у всех четырех видов грибов в присутствии всех исследованных видов дрожжей. В монокультуре грибов выростов не обнаружено.

Коралловидные структуры наблюдали в следующих совместных культурах: *Pleurotus citrinopileatus* с *Cryptococcus albidus* и *Metschnikowia pulcherrima*; *Pleurotus dja-*

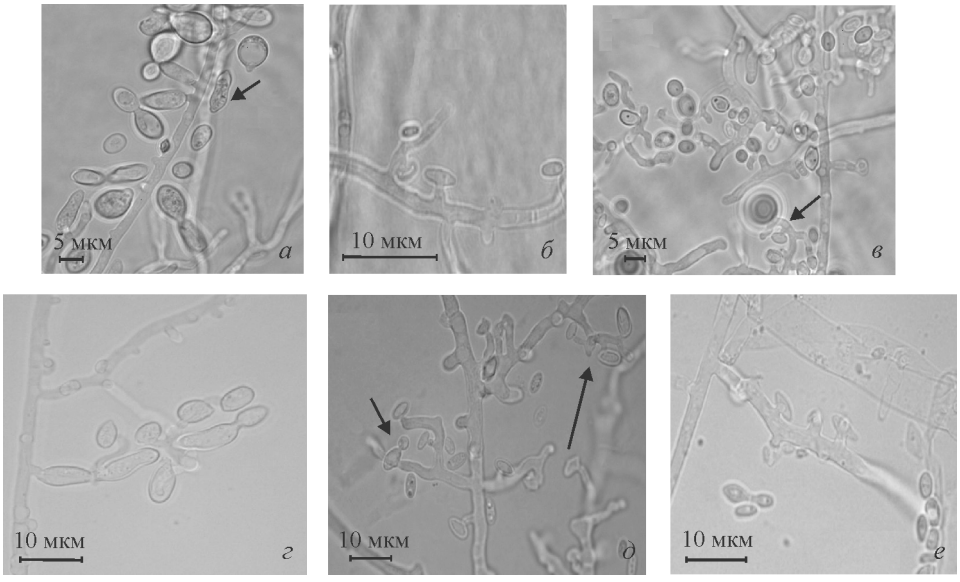

Рис. 1. Коралловидные структуры и сосочковидные выросты на гифах.

Совместные культуры: *а* — *Pleurotus citrinopileatus* и *Cryptococcus albidus*, *б* — *P. pulmonarius* и *Hanseniaspora uvarum*, *в* — *P. djamor* и *Metschnikowia pulcherrima*, *г* — *P. djamor* и *C. albidus*, *д* — *P. djamor* и *Rhodotorula minuta*, *е* — *P. eryngii* и *H. uvarum* (стрелками указаны контакты мицелия грибов и дрожжевых клеток).

mor с *Cryptococcus albidus*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula minuta* и *Saccharomyces cerevisiae*; *Pleurotus eryngii* с *Hanseniaspora uvarum* (рис. 1). Коралловидные структуры представляли собой систему часто расположенных сосочковидных выростов и коротких (5—15 мкм) разветвленных веточек гиф, увеличивающих поверхность контакта мицелия с микроколониями дрожжей. В литературе коралловидные структуры описаны как специализированные приспособления для захвата клеток дрожжей, состоящие из абсорбционных гиф, которые переваривают содержимое дрожжевых клеток и транспортируют питательные вещества к основному мицелию (Barron, 1988).

Контакты сосочковидных выростов и дрожжевых клеток были обнаружены в следующих совместных культурах: *Pleurotus citrinopileatus* и *P. djamor* со всеми исследованными видами дрожжей; *P. eryngii* с *Cryptococcus albidus, Hanseniaspora uvarum* и *Saccharomyces cerevisiae*; *Pleurotus pulmonarius* с *Cystofilobasidium capitatum*, *Cryptococcus albidus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula minuta* и *Saccharomyces cerevisiae* (табл. 1).

Таблица 1

Наличие контактов между гифами видов рода *Pleurotus* и дрожжевыми клетками

Виды	*P. citrinopileatus*	*P. djamor*	*P. eryngii*	*P. pulmonarius*
Cystofilobasidium capitatum	+	+	–	+
Cryptococcus albidus	+	+	+	+
Hanseniaspora uvarum	+	–	+	+
Metschnikowia pulcherrima	–	+	–	–
Phodotorula minuta	+	+	–	+
Saccharomyces cerevisiae 3785	+	+	+	+
S. cerevisie 3809	+	+	+	+

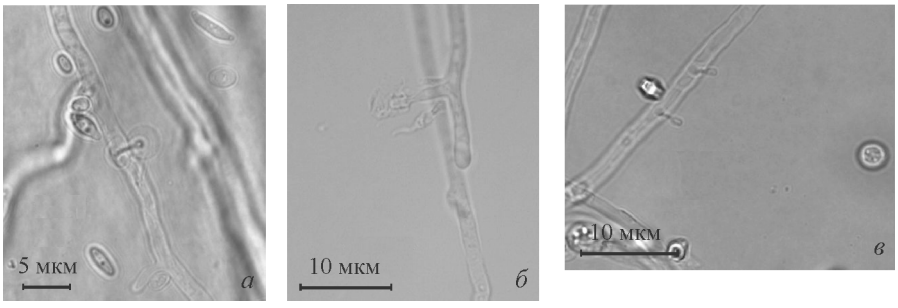

Рис. 2. Головчатые выросты на гифах.

а — совместная культура *Pleurotus pulmonarius* и *Hanseniaspora uvarum*, *б* — монокультура *P. djamor*, *в* — совместная культура *P. eryngii* и *Saccharomyces cerevisiae*.

Наибольшее количество контактов наблюдали в совместных культурах *Pleurotus citrinopileatus* с *Cryptococcus albidus*; *Pleurotus djamor* с *Cryptococcus albidus* и *Rhodotorula minuta*; *Pleurotus eryngii* и *P. pulmonarius* с *Hanseniaspora uvarum.*

Головчатые выросты наблюдали в монокультурах *Pleurotus djamor* и *P. pulmonarius*, а также в совместных культурах всех четырех видов вешенки (рис. 2). Эти выросты дифференцированы на ножку 3—6 мкм дл. и расширенную апикальную часть 2—3 мкм дл. На апикальной части выроста выделяется сферическая капля прозрачного секрета диам. 5 мкм (для *P. pulmonarius*), который быстро растворяется при соприкосновении с водой. Головчатые выросты зависимы от материнской клетки гифы и не являются структурами размножения, так как не содержат ядер (Камзолкина и др., 2006). По некоторым данным (Barron, 2003) они выделяют токсины, парализующие нематод. Предположительно головчатые выросты несут и ряд других функций, не связанных с образованием нематотоксинов.

В совместной культуре *Pleurotus citrinopileatus* с *Metschnikowia pulcherrima* дважды наблюдали образование ловчих петель: гифы гриба закручивались, образуя два витка спирали, внутренний диаметр петли составлял 10—12 мкм, внешний — 17 мкм (рис. 3). Ловчие петли являются характерным образованием для мицелия хищных почвенных грибов, а также были отмечены у *Pleurotus ostreatus* в присутствии нематод (Barron, 2003).

Кроме того, наличие взаимодействия всех видов вешенки с промышленно ценным видом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* позволяет предполагать, что добавление

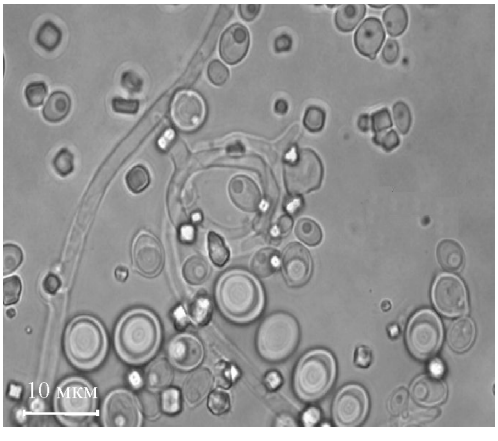

Рис. 3. Ловчая петля, образованная гифами мицелия *Pleurotus citrinopileatus* в совместной культуре с *Metschnikowia pulcherrima*.

Таблица 2

Параметры плодовых тел рода *Pleurotus* в эксперименте по выгонке

Параметры	Контроль		*Hanseniaspora uvarum*		*Saccharomyces cerevisiae*	
	Pleurotus citrinopileatus	*P. djamor*	*Pleurotus citrinopileatus*	*P. djamor*	*Pleurotus citrinopileatus*	*P. djamor*
Время развития плодового тела, сутки	5.0	6.3 ± 1.2	5.0	6.0 ± 1.2	5.7 ± 1.2	6.8 ± 1.0
Исходное количество примордиев, штуки	22 ± 10	39 ± 7	23 ± 15	29 ± 4	22 ± 5	33 ± 3
Конечное количество плодовых тел в урожае, штуки	8 ± 2	8 ± 2	4 ± 1	6 ± 2	7 ± 3	9 ± 1
Масса урожая с одной банки, г	14.5 ± 1.3	17.7 ± 4.4	12.1 ± 9.2	16.3 ± 2.2	16.0 ± 2.8	14.8 ± 2.4

этих дрожжей в субстрат культивирования будет способствовать росту мицелия и образованию плодовых тел грибов.

Внесение суспензии дрожжей в субстрат культивирования не оказывало значительного влияния на скорость зарастания субстрата мицелием. Все образцы, как контрольные, так и содержащие суспензию дрожжей, были помещены во влажную камеру для выгонки одновременно, на 14-е сутки после инокуляции субстрата. В присутствии дрожжей *Hanseniaspora uvarum* для *Pleurotus djamor* было отмечено, что время созревания плодовых тел от момента появления примордиев до сбора урожая сократилось по сравнению с контролем на 0.3 суток в среднем. Вес урожая и количество плодовых тел с одной банки были незначительно больше, чем в контроле, в присутствии суспензии *Saccharomyces cerevisiae* только для *Pleurotus citrinopileatus* (табл. 2). Плодовые тела, полученные на субстрате с добавлением суспензии дрожжей, по морфологии, окраске, запаху не отличались от плодовых тел в контроле.

Полученные результаты демонстрируют способность мицелия четырех видов вешенки переходить от сапротрофного питания к паразитизму и использовать дрожжевые клетки в качестве источника питания в условиях дефицита азота и углерода в лабораторных условиях на голодном агаре. Для видов *P. citrinopileatus*, *P. djamor* и *P. eryngii* это свойство отмечено впервые.

По результатам первой волны плодоношения показано слабоположительное влияние дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на накопление биомассы *Pleurotus citrinopileatus* в процессе культивирования при данных условиях плодоношения в камере.

Авторы благодарят сотрудника кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М. В. Ломоносова чл.-кор. РАН И. Ю. Чернова за предоставленные штаммы дрожжей.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 07-04-00274-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Камзолкина О. В., Гришанина А. Н., Панчева Е. В., Волкова В. Н., Козлова М. В. Микроморфологические особенности штаммов Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quél. и P. ostreatus (Jacq.) P. Kumm., культивируемых отдельно и совместно с дрожжами // Цитология. 2006. Т. 48(2). С. 153—160.

Barron G. L. Microcolonies of bacteria as a nutrient source for lignicolous and other fungi // Can. J. Bot. 1988. Vol. 66. P. 2505—2510.

Barron G. L. Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle // Biodiversity. 2003. Vol. 4. P. 3—9.

Hutchison L. J., Barron G. L. Parasitism of yeasts by lignicolous Basidiomycota and other fungi // Can. J. Bot. 1996. Vol. 74. P. —742.

Hutchison L. J., Barron G. L. Parasitism of algae by lignicolous Basidiomycota and other fungi // Can. J. Bot. 1997. Vol. 75. P. 1006—1011.

Jose N., Ajith T. A., Jananrdhanan K. K. Antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quél. (Agaricomycetidae) // Int. J. Med. Mushrooms. 2002. Vol. 4. P. 329—335.

Lindequist U., Niedermeyer T. H. J., Jülich W.-D. The pharmacological potential of mushrooms. Review // eCAM. 2005. Vol. 2 (3). P. 285—299.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
dandylion.ds@gmail.com

Поступила 20 V 2008

РЕЗЮМЕ

Исследовалась микроморфология мицелия *Pleurotus citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. eryngii* и *P. pulmonarius* в совместных культурах с базидиомицетными (*Cryptococcus albidus*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodotorula minuta*) и аскомицетными (*Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* 3785, 3809) дрожжами на голодном агаре. В совместной культуре описаны различные изменения морфологии мицелия: повышение частоты ветвления гиф, образование особых коротких сосочковидных выростов гиф, ловчих петель, коралловидных структур. Эти структуры обеспечивают контакт между мицелием и дрожжевыми клетками. На голодном агаре некоторые виды *Pleurotus* могут паразитировать на дрожжевых клетках. На лузге подсолнечника биомасса плодовых тел *P. citrinopileatus* увеличивалась, если к субстрату добавляли суспензию клеток *S. cerevisiae*.

Ключевые слова: вешенка, совместное культивирование, эпифитные дрожжи.

SUMMARY

Micromorphology of the mycelium of *Pleurotus citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. eryngii* and *P. pulmonarius* was observed in mixed cultures with basidiomycetous (*Cryptococcus albidus*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodotorula minuta*) and ascomycetous (*Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* 3785, 3809) yeasts on water agar. Various changes in the mycelial morphology were described in mixed cultures: increase of the frequency of hyphal branching, special short nipple-like branches on hyphae, rings, coralloid hyphae. These structures provide the contact between the fungal mycelium and the yeast cells. On water agar some *Pleurotus*-species can be parasites on the yeast cells. On sunflower seed's peel the crop biomass of the fruiting bodies of *P. citrinopileatus* increased when *S. cerevisiae* cell suspension was added in the substrate.

Key words: *Pleurotus*, mixed culture, epiphytic yeasts.