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. 4

УДК 582.284.99 : 581.144.1

© *Е. Л. Постнова, Л. А. Завьялова, И. Д. Инсарова*

ФОРМИРОВАНИЕ АТИПИЧНЫХ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ И ПРИМОРДИЕВ *GANODERMA LUCIDUM* IN VITRO И ВЛИЯНИЕ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

POSTNOVA E. L., ZAVYALOVA L. A., INSAROVA I. D. FORMATION OF FRUIT BODIES AND PRIMORDIA OF *GANODERMA LUCIDUM* IN VITRO AND INFLUENCE OF ABIOTIC FACTORS ON THIS PROCESS

Ganoderma lucidum (Curtis: Fr.) P. Karst., трутовик лакированный, является представителем ксилотрофных базидиомицетов, вызывающих белую гниль лиственных пород. В традиционной медицине Китая, Японии и Кореи этот вид широко используется как источник биологически активных добавок с широким спектром действия (Stamets, 1993). Впервые культивирование *G. lucidum* было проведено в Японии и Корее в 80-х годах прошлого столетия (Nanamiya, 1982; по: Seo, Shin, 1995).

Возросший интерес к культивированию базидиом данного вида как источника важных биологически активных веществ определил значимость одного из этапов работы — изучения особенностей чистых культур штаммов *G. lucidum*.

Наши исследования штаммов *G. lucidum* выявили способность чистых культур образовывать атипичные плодовые тела (АПТ), которые не развиваются в типичные базидиомы при поверхностном культивировании на агаризованных средах и постоянном освещении. Базидии и базидиоспоры в этом случае формируются прямо на поверхности АПТ. Аналогичные структуры отмечены в работе Сео и Шин (Seo, Shin, 1995) при исследовании штаммов *G. lucidum* из Кореи и Папуа — Новой Гвинеи.

Поскольку получение базидиом данного ксилотрофного базидиомицета — длительный и трудоемкий процесс, мы сочли возможным разработать более простой способ получения материала для модельных опытов с использованием АПТ.

В данной работе исследовано влияние абиотических факторов — света, аэрации и источников углеродного и азотного питания на образование АПТ и примордиев, а также морфология этих структур у 10 штаммов *G. lucidum* различного географического происхождения. Кроме того, были изучены 2 штамма *G. applanatum* (Pers.) Pat.

Дикариотические штаммы были взяты из коллекции культур кафедры микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова (МГУ), НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (табл. 1). Культуры хранили при 2 °С на пшеничном агаре, содержащем опилки лиственных пород. Пересевы на свежеприготовленную среду осуществляли 1 раз в год.

Способность к формированию АПТ и примордиев изучали на твердых средах с различными источниками углерода и азота. За исходную брали среду следующего состава (г): 0.5 — $MgSO_4$, 0.46 — KH_2PO_4, 1 — K_2HPO_4, 2 — пептона, 2 — дрожжевого экстракта, 20 — глюкозы, 20 — агара, 1 л воды (Raudaskoski, Viitanen, 1982). В эксперименте состав среды варьировали, изменяя источники углерода и азота (табл. 2).

Таблица 1

Штаммы грибов рода *Ganoderma*, использованные в работе

Штамм	Источник поступления	Год поступления в коллекцию	Место выделения (субстрат)
G.L 1	МГУ	1999	Кавказ (дуб)
G.L 2	НИИ по изысканию новых антибиотиков	1999	Кавказ (бук)
G.L 3	Корея	1999	—
G.L 4	Франция	2000	—
G.L 5	США	2001	—
G.L 6	МГУ	2001	Московская обл.
G.L 7	То же	1998	То же
G.L 8	НИИ по изысканию новых антибиотиков	2004	Кавказ
G.L 9	То же	2004	»
G.L927	ВКМП	1961	Австрия
G. APP 926	То же	1930	Великобритания
G.APP 632	» »	1991	—

Примечание. G.L — *G. lucidum*, G.APP — *G. applanatum.* То же для табл. 3—7. Для штаммов субстрат неизвестен, за исключением G.L 1 и G.L 2.

Мицелиальные диски (5 мм в диам.) помещали в чашки Петри, содержащие 25 мл среды, и инкубировали 30 суток при температуре 25 ± 1 °С в термостате без освещения и в камере при постоянном освещении лампами дневного света Philips (1200 лк). Для оценки влияния аэрации часть чашек Петри после инокуляции заклеивали двойным слоем пленки PARAFILM «M». Скорость роста измеряли ежедневно, начиная с 3 суток, в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

Морфологию АПТ и примордиев исследовали на временных препаратах с использованием светового микроскопа (СМ) МБР-1 (увел. 80 и 400), СМ Axioskop 40 FL, оснащенного цифровой камерой AxioCam MRc для фотографирования препаратов (увел. 80, 200, 400 и 1000), а также сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Jeol JSM-T300. Препараты для СЭМ готовили следующим способом: кусочки и срезы АПТ и примордиев фиксировали 72 ч в парах осмия (OsO_4), затем сушили в течение 2—3 суток и напыляли золотом.

При изучении влияния кислотности на образование АПТ и примордиев использовали среду 1 с исходным pH 5. Для получения нужных значений pH брали стерильные растворы HCl (1 или 6 М) и NaOH (1 или 6 М); pH доводили до необходимой величины после стерилизации среды во избежание гидролиза и изменения значений кислотности (Roberts, 2004). Оптимальным считалось значение pH, при котором наблюдалась максимальная скорость роста культуры.

Для сравнения формы размеров базидиоспор АПТ и базидиоспор типичных (полностью сформированных) базидиом были получены плодовые тела интенсивным ме-

Таблица 2

Среды, использованные в работе

Варианты сред	Источники азота		Источники углерода	
	пептон (2 г/л)	соевая мука (10 г/л)	глюкоза (20 г/л)	мальтоза (20 г/л)
1	+		+	
2		+		+
3	+			+
4		+	+	

Таблица 3

Скорость роста штаммов в зависимости от аэрации и освещенности, мм/сутки

Штамм	На свету		В темноте	
	с аэрацией	без аэрации	с аэрацией	без аэрации
G.L 1	2.4 ± 0.5	5.2 ± 2.4	8.0 ± 2.7	10.1 ± 1.3
G.L 2	10.0 ± 1.0	14.1 ± 2.3	17.3 ± 1.5	23.6 ± 1.7
G.L 3	4.0 ± 1.1	6.5 ± 2.0	9.6 ± 1.3	16.4 ± 1.5
G.L 4	11.0 ± 2.1	14.8 ± 2.6	19.2 ± 2.5	24.7 ± 2.9
G.L 5	18.0 ± 0.5	20.4 ± 3.0	24.3 ± 2.0	26.8 ± 3.2
G.L 6	2.0 ± 0.3	4.5 ± 1.6	8.0 ± 1.3	11.5 ± 2.0
G.L 7	3.1 ±0 .2	4.6 ± 1.2	7.5 ± 1.7	10.5 ± 2.4
G.L 8	14.0 ± 2.4	19.3 ± 2.1	23.1 ± 3.4	27.0 ± 2.1
G.L 9	13.0 ± 1.9	15.0 ± 2.0	20.4 ± 2.1	25.1 ± 1.8
G.L 927	9.2 ± 0.9	13.2 ± 1.8	18.9 ± 1.4	24.3 ± 2.3
G.APP 926	6.3 ± 1.0	12.3 ± 1.8	17.4 ± 2.6	23.2 ± 1.9
G.APP 632	12.1 ± 1.2	15.8 ± 1.9	20.3 ± 2.5	24.6 ± 2.1

тодом (Stamets, 1993). Субстратом для получения посевного мицелия служило зерно пшеницы, которое варили, сушили и смешивали для разрыхления с мелом (1—1.5 %). Подготовленный субстрат раскладывали в стеклянные колбы с ватной пробкой и стерилизовали 30 мин при давлении 1 атм. После охлаждения зерно инокулировали и помещали в термостат при температуре 24—25 °С, периодически встряхивая. В качестве субстрата для получения плодовых тел использовали дубовые опилки и подсолнечную лузгу. Дубовые опилки заливали горячей водой на 24 ч и добавляли пшеничные отруби в пропорции 4 : 1 за 5 ч до подсушивания. Лузгу также замачивали в течение 24 ч. Влажность субстрата составляла 65—70 %. Для разрыхления в субстрат добавляли 1—1.5 % мела. Полипропиленовые пакеты (27 × 12 см) заполняли субстратом на ½ объема, закрывали ватной пробкой и дважды по 30 мин стерилизовали при давлении в 0.5 атм. Инкубацию проводили в термостате при температуре 24—25 °С до полной колонизации субстрата мицелием. Затем пакеты переносили в камеру с регулируемым освещением и температурой 19—24 °С для выгонки плодовых тел.

Условия, способствующие формированию АПТ и примордиев, изучали на изолятах, выращенных на агаризованных средах в течение 30 суток с освещенностью и без

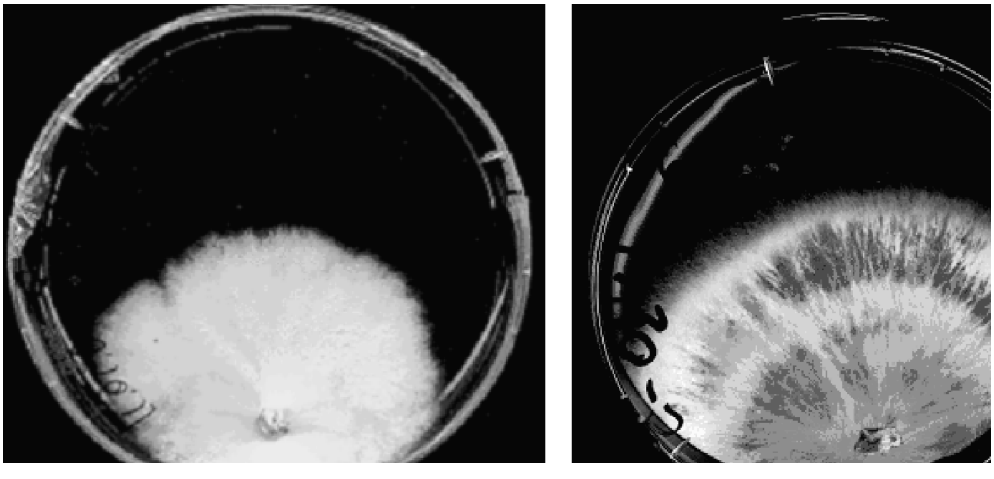

Рис. 1. Рост штамма G.L 3 на свету (*а*) и в темноте (*б*).

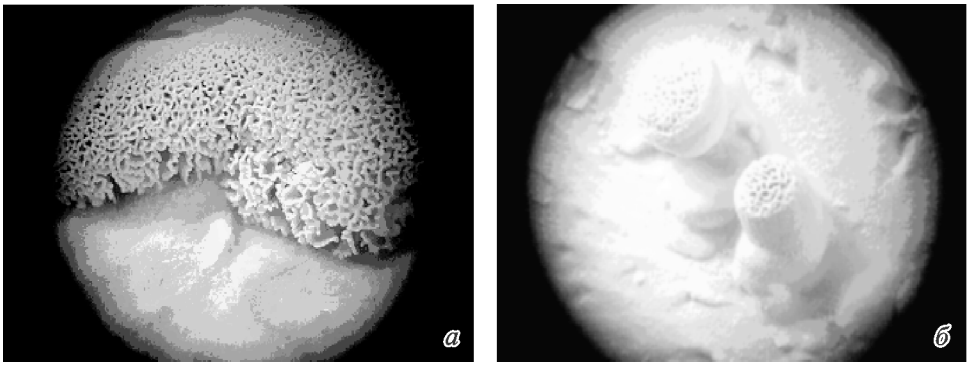

Рис. 2. АПТ штамма G.L 3 (*а*) и примордии штамма G.L 4 (*б*).

нее, с аэрацией и при ее отсутствии. Мицельный рост всех штаммов ингибировался наличием света и аэрацией (табл. 3). Аэрация приводила к уплотнению мицелиального мата, а отсутствие света — к сильной пигментации (рис. 1). Свет стимулировал формирование коричневых кораллоподобных АПТ на белом или слегка пигментированном мицелии у штаммов G.L 3 и G.L 9 из Кореи и Кавказа соответственно на 7-е и 5-е сутки (рис. 2, *а*). У остальных штаммов, кроме G.L 6 и G.L 7, наблюдалось образование примордиев на 9—14-е сутки (табл. 4, 5; рис. 2, *б*). У штамма G.L 1 примордии образовывались только на среде 3 с мальтозой на 10—12-е сутки. У штаммов G.L 6 и G.L 7 из Подмосковья отмечен лишь мицелиальный рост. Базидии и базидиоспоры формировались прямо на поверхности АПТ штаммов G.L 3 и G.L 9 и апикальной части примордиев штаммов G.L 8 и G.L 4 (рис. 2, *а*, *б*). Штаммы G.L 1, G.L 2, G.L 5 и G.L 927 базидии не образовывали. У всех штаммов без освещения отмечен только мицелиальный рост вне зависимости от аэрации. Аэрация замедляла мицелиальный рост как в темноте, так и при освещении, но в то же время являлась необходимым условием формирования АПТ и примордиев.

Морфологию АПТ и базидиоспор изучили с помощью светового и сканирующего микроскопов. Оказалось, что АПТ образовали вегетативные и скелетные гифы, а также кутикулярные клетки, которые имеют коралловидную форму. Для сравнительного анализа размеров и морфологии базидиоспор были получены типичные плодовые тела (рис. 3) и споровые отпечатки семи штаммов. Результаты анализа приведены в табл. 5.

Базидиоспоры АПТ были меньшего размера, но сходной морфологии, со спорами типичных базидиом. Базидии имели 4 стеригмы. Базидиоспоры коричневые в массе, яйцевидно-эллипсоидальные, на вершине усеченные, с двойной оболочкой. Эндоспо-

Таблица 4

Структуры, образуемые штаммами *Ganoderma lucidum* и *G. applanatum*

Штамм	Структура	Штамм	Структура
G.L 1	ПР	G.L 7	—
G.L 2	ПР + Б	G.L 8	ПР + Б
G.L 3	АПТ + Б	G.L 9	АПТ + Б
G.L 4	ПР + Б	G.L 927	ПР
G.L 5	ПР + Б	G.APP 926	ПР
G.L 6	—	G.APP 632	ПР + Б

Примечание. ПР — примордии, АПТ — атипичные плодовые тела, Б — базидиомы при интенсивном культивировании. То же для табл. 6.

Таблица 5

Размер базидиоспор из АПТ и из типичных базидиом

Показатели	G.L 2	G.L 3	G.L 4
Размер спор АПТ, мкм	—	7.6—9.5 × 4.2—4.9	—
Споровый индекс	—	1.8	—
Размер спор базидиом, мкм	9.5—12.1 × 6.5—7.2	8.7—10.2 × 5.6—6.4	10.6—12.4 × 6.9—7.9
Споровый индекс	1.46	1.55	1.53

Таблица 5 (*продолжение*)

Показатели	G.L 5	G.L 8	G.L 9	G.APP 632
Размер спор АПТ, мкм	—	—	8.3—10.1 × × 4.3—5.2	—
Споровый индекс	—	—	1.9	—
Размер спор базидиом, мкм	11.5—12.9 × × 7.4—9.1	11.7—13.1 × × 7.7—9.1	10.5—12.6 × × 6.4—7.5	6.5—7.1 × × 5.8—6.3
Споровый индекс	1.55	1.52	1.6	1.1

Примечание. Споровый индекс — отношение длины спор к ширине (Seo, Shin, 1995).

рий морщинистый или шиповатый, эписпорий гладкий гиалиновый (рис. 4, 5). Базидиоспоры, полученные из обоих типов плодовых тел на твердой среде, прорастали на 3-и сутки типичным монокариотическим мицелием без пряжек. Источники углеродного и азотного питания не оказывали существенного влияния на скорость образования АПТ и примордиев (табл. 6) и способность к их формированию. Лишь для штамма G.L 1 с Кавказа определяющим оказалось наличие в среде мальтозы. На всех средах, использованных в данной работе, АПТ и примордии появлялись в разные интервалы времени (в пределах 7—17 суток), но имели сходную морфологию (табл. 6).

Оптимальные значения pH для мицелиального роста разных штаммов варьировали от 5 до 7 (табл. 7). Культивирование на среде с иными значениями pH ингибировало появление АПТ и примордиев. АПТ и примордии при оптимальных значениях pH появлялись у разных штаммов на 7—10-е сутки. Формирование этих структур задерживалось на трое и более суток при культивировании штаммов на среде, кислотность которой отклонялась от оптимальных значений pH хотя бы на единицу. Происходило ингибирование как мицелиального роста, так и появления АПТ и примордиев при pH больше 7 и меньше 5.

Таблица 6

Скорость формирования АПТ и примордиев (ПР) на разных средах

Штамм	Среда 1/сутки роста	Среда 2/сутки роста	Среда 3/сутки роста	Среда 4/сутки роста
G.L 1	—	—	ПР 10—12	—
G.L 2	ПР 10—12	ПР 9—11	ПР 14—16	ПР 12—14
G.L 3	АПТ 7—10	АПТ 7—9	—	—
G.L 4	ПР 10—12	ПР 14—16	ПР 14—17	ПР 11—13
G.L 5	ПР 8—11	ПР 10—14	ПР 14—16	ПР 9—10
G.L 8	ПР 10—12	ПР 7—9	ПР 10—12	ПР 12—16
G.L 9	АПТ 5—10	АПТ 8— 12	АПТ 7—10	АПТ 10—12
G.L 927	ПР 14—16	ПР 11—13	ПР 14—15	ПР 14—16
G. APP 926	ПР 14—16	ПР 17—20	ПР 14—16	—
G. APP 632	ПР 9—12	ПР14—16	ПР 15—17	ПР 20—22

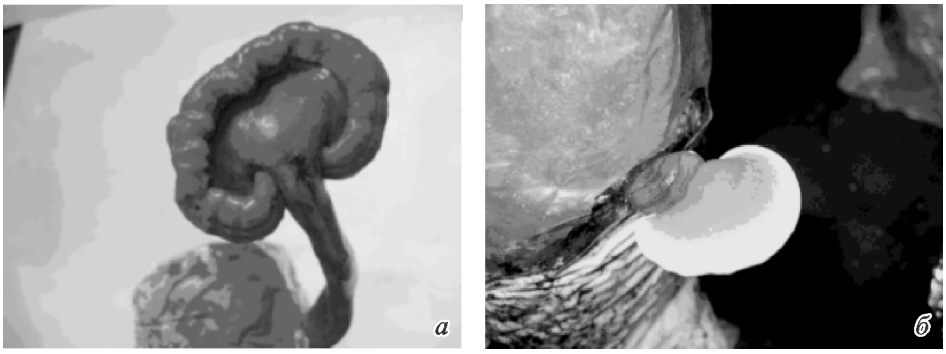

Рис. 3. Типичные базидиомы штаммов G.L 5 (*а*) и G.L 8 (*б*).

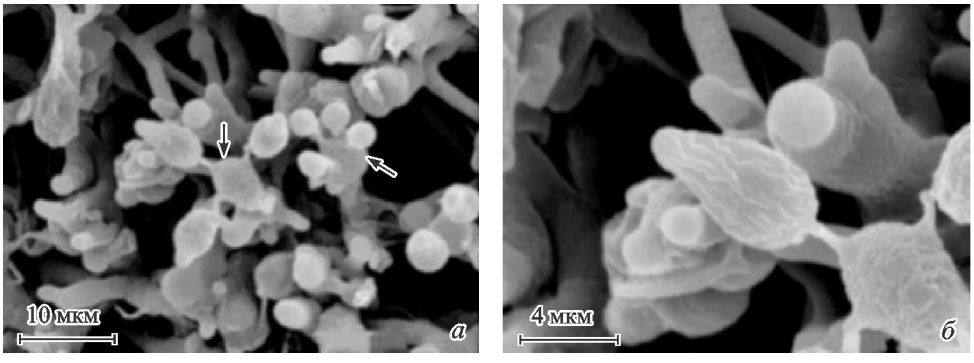

Рис. 4. Базидии (*а*) и базидиоспоры (*б*) АПТ штамма G.L 3 (СЭМ).

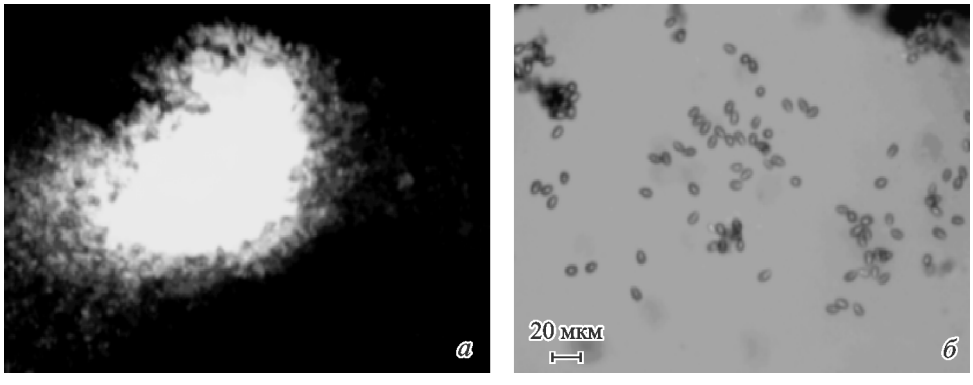

Рис. 5. Базидиоспоры АПТ G.L 3 (*а*) и G.L 9 (*б*). AxioCam MRc.

Таблица 7

Оптимальные значения pH для мицелиального роста штаммов *Ganoderma lucidum* и *G. appalnatum*

Штамм	Значения pH	Штамм	Значения pH
G.L 1	6	G.L 7	5
G.L 2	6	G.L 8	5
G.L 3	5	G.L 9	5
G.L 4	5	G.L 927	6
G.L 5	5	G.APP 926	5
G.L 6	5	G.APP 632	7

Базидии и базидиоспоры высших базидиальных грибов формируются либо на гименциальных пластинках (у большинства агарикоидных базидиомицетов), либо в трубочках (у афиллофороидных базидиомицетов). Однако на искусственных средах развитие базидий и базидиоспор может происходить в гимениальном слое, сформированном прямо на мицелии без формирования плодовых тел. Такое явление было описано для *Crinipellis perniciosa* (Griffith, Hedger, 1993), *Ganoderma lucidum* (Seo, Shin, 1995), *Ceratobasidium* sp. (Uchida et al., 1986), *Lyophyllum tylicolor* (Yamanaka, Sagara, 1990) и др.

В нашей работе также установлено, что для двух штаммов *G. lucidum* характерно образование базидий и базидиоспор помимо формирования типичных плодовых тел. Освещенность и аэрация стимулируют образование АПТ и примордиев. Способность к формированию АПТ является штаммовым признаком и не зависит от состава агаризованной среды, значений pH и возраста колоний. АПТ сформированы вегетативными и скелетными гифами и кутикулярными клетками, что полностью согласуется с данными более ранних работ по морфологии базидиом *G. lucidum* (Бондарцева, 1998; Moncalvo, 2000; Гарибова и др., 2003). Базидии формируются из генеративных гиф на поверхности АПТ или апексах примордиев. Образуются базидиоспоры, характерные для вида, но их размеры на 10—20 % меньше спор, полученных от типичных базидиом. Исследованные штаммы *G. applanatum* атипичных плодовых тел не формировали.

Изученные источники углеродного и азотного питания не оказывают влияния на скорость образования примордиев и не влияют на способность к их формированию. Свет и аэрация — необходимые условия развития исследуемых структур. Отклонение значений pH от оптимальных оказывает ингибирующее действие на появление АПТ и примордиев. Базидиоспоры, образовавшиеся на поверхности АПТ, жизнеспособны.

Полученные данные имеют существенное значение для использования штаммов в модельных опытах, так как открывают простой и доступный способ получения материала для различных лабораторных исследований.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 08-04-00492-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бондарцева М. А. Определитель грибов России. Вып. 2: Пор. Афиллофоровые. СПб.: Наука, 1998. 390 с.

Гарибова Л. В., Антимонова А. В., Завьялова Л. А., Краснопольская Л. М. Рост и морфологические признаки мицелия трутовика лакированного Ganoderma lucidum в зависимости от условий культивирования // Микология и фитопатология. 2003. Т. 37, вып. 3. С. 14—19.

Griffith G. M., Hedger J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen Crinipellis perniciosa using a bran-vermiculite medium // Europ. J. Plant Pathol. 1993. Vol. 99, N 4. P. 227—230.

M o n c a l v o J. M. Systematics of Ganoderma // Ganoderma Disease of Perennial Crops. CABI Publishing, 2000. P. 23—52.

R a u d a s k o s k i M., V i i t a n e n H. Effect of aeration and light on fruit body induction in Schizophyllum commune // Trans. Brit. Mycol. Soc. 1982. Vol. 78. P. 89—96.

R o b e r t s L. M. Australian Ganoderma: Identification, growth and antibacterial properties. 2004. P. 51.

S e o G. S., S h i n G. C. Formation of atypical fruiting structures in Ganoderma lucidum isolates on a nutrient agar medium // Mycoscience. 1995. Vol. 36. P. 1—7.

S t a m e t s P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 1993. P. 335—337.

U c h i d a J. Y., A r a g a k i M., Y a h a t a P. S. Basidiospore formation by Ceratobasidium sp. on agar // Mycologia. 1986. Vol. 78. P. 587—592.

Y a m a n a k a T., S a g a r a N. Development of basida and basidiospores from slide cultured mycelia in Lyophyllum tylicolor (Agaricales) // Mycol. Res. 1990. Vol. 94. P. 847—850.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова
insarovaid@mail.ru

Поступила 5 XII 2008

Р Е З Ю М Е

В различных географических регионах были собраны *Ganoderma lucidum* (10 штаммов) и *G. applanatum* (2 штамма), у которых протестировано образование атипичных плодовых тел (АПТ) и примордиев. Исследовано влияние освещенности, аэрации и значения pH агаризованной среды на формирование этих структур. АПТ появлялись на поверхности мицелия, базидии и жизнеспособные базидиоспоры образовывались на АПТ и апексах примордиев. Базидиоспоры АПТ были мельче базидиоспор, образовавшихся на типичных плодовых телах, но их морфологические характеристики были идентичны. Эти результаты позволяют быстро получить генетический материал непосредственно на чашках Петри, минуя трудоемкий и длительный процесс выгонки плодовых тел.

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*, атипичные плодовые тела (АПТ), абиотические факторы, состав среды, базидиоспоры.

S U M M A R Y

Total of 10 strains of *Ganoderma lucidum* and 2 strains of *G. applanatum* collected from various geographical regions were tested for the formation of atypical fruiting structures (AFS) and fruit body primordial. Effects of light, aeration and pH level on the formation of these structures on nutrient agar media were investigated. Brown AFS appeared on the white mycelial colony, basidia and basidiospores were produced on the external side of the AFS and on the apices of some primordia. AFS basidiospores were smaller than basidiospores from normally formed fruit body, but their other morphological characteristics were almost the same. The data are important for the model investigations and breeding practice.

Key words: *Ganoderma lucidum*, atypical fruiting structures (AFS), abiotic factors, medium composition.