

The study of morphological and cultural properties of *Sparassis crispa* (Sparassidaceae, Polyporales)

O.B. Mykchaylova¹, A.P. Gryganskyi², M.L. Lomberg¹, N.A. Bisko¹

¹M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences
Kiev, Ukraine, e-mail: mikhajlova.ok@gmail.com, orcid.org/0000-0001-9212-5094,
e-mail: margarita@lomberg.kiev.ua, orcid.org/0000-0001-7036-7850,
e-mail: bisko_nina@ukr.net, orcid.org/0000-0003-1894-0896

²LF Lambert Spawn Co., 1507 Valley Rd, Coatesville, PA 19320, USA
e-mail: andrii.gryganskyi@gmail.com, orcid.org/0000-0002-6037-0092

Submitted: 23.10.2017. Accepted: 01.12.2017

A verification of *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr. strains of the IBK Mushroom Culture Collection using molecular-genetic and cultural-morphological methods were done. For all *S. crispa* strains a complete determination of the nucleotide sequences of the internal transcribed spacer: ITS1, 5.8S and ITS2 regions of rRNA, as well as the partial determination of 18S and 28S sequences surrounding the ITS, was performed. As a result of the search in the gene bank, the *S. crispa* samples deposited there showed 99–98% identity with the sequences we received, thus confirming the species of the examined strains. On the basis of the sequences we received, investigated strains were registered in NCBI GenBank. To confirm the taxonomic affiliation of the strains we studied their cultural and morphological characteristics. Microstructures of vegetative mycelium by optical and scanning electron microscopy were investigated. In all *S. crispa* cultures we observed the hyphae with regular one-sided gapless clamp connections, numerous secretory cells on the surface of the hyphae, anastomoses, filamentous strands and films. We studied the growth rate and morphology of the strains on seven agar nutrient media. According to the radial growth rate of *S. crispa* cultures can be placed to the very slowly growing mushrooms, growth rate of 0.5–2.8 mm/day. We found the selective media such as malt agar with the addition of pine sawdust (SS) and larch sawdust (SM) as most favorable for the vegetative growth and generative stage for all strains, temperature of incubation was 26 ± 0.1 °C. For mycelial growth the critical temperature was 39 ± 0.1 °C for *S. crispa* strains 312, 314 and 40 ± 0.1 °C for the strains 304, 2004. We confirmed belonging of studied strains to *S. crispa* species according to established morphological and cultural characteristics. This result coincided with the results of DNA typing. Thus, the obtained mycelium growth parameters on nutrient media, micro- and macromorphological characteristics can be used as additional taxonomic characteristics of *S. crispa* culture in the vegetative stage of growth. The strain *S. crispa* 314 may become a potential producer for new fungal biotechnologies in Ukraine in the near future and reintroduction of this species in the nature.

Key words: *Sparassis crispa* strains; molecular genetics and culture-morphological methods; scanning electron microscopy; growth rate; critical temperatures

Морфолого-культуральні властивості рідкісного лікарського гриба *Sparassis crispa* (Sparassidaceae, Polyporales)

О.Б. Михайлова¹, А.П. Григанський², М.Л. Ломберг¹, Н.А. Бісько¹

¹Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України
Київ, Україна, e-mail: mikhajlova.ok@gmail.com, orcid.org/0000-0001-9212-5094,
e-mail: margarita@lomberg.kiev.ua, orcid.org/0000-0001-7036-7850,
e-mail: bisko_nina@ukr.net, orcid.org/0000-0003-1894-0896

²LF Lambert Spawn Co., 1507 Valley Rd, Coatesville, PA 19320, USA
e-mail: andrii.gryganskyi@gmail.com, orcid.org/0000-0002-6037-0092

Представлено результати молекулярно-генетичних і культурально-морфологічних досліджень чотирьох штамів цінного лікарського гриба *S. crispa*, які зберігаються у Колекції культур шапинкових грибів (ІБК). Для всіх штамів *S. crispa* проведено повне визначення нуклеотидних послідовностей внутрішнього транскрипційного спейсеру: ITS1, 5.8S та ITS2 регіонів рРНК, а також часткове визначення 18S та 28S послідовностей, що оточують ITS. За результатом пошуку у генбанку (GenBank) депоновані там послідовності зразків *S. crispa* показали 99-98% ідентичності з отриманими нами послідовностями, підтвердивши, тим самим, вид досліджених штамів. На основі молекулярного аналізу ІТС послідовності штамів *S. crispa* внесено до бази даних NCBI GenBank. Вивчено мікроструктури вегетативного міцелію методами оптичної та сканувальної електронної мікроскопії. Для всіх культур *S. crispa* були характерні гіфи з регулярними односторонніми пряжками без зазору, численні секреторні клітини на поверхні гіф, анастомози, міцеліальні тяжі і півки. Досліджено ріст та морфологію штамів на семи агаризованих живильних середовищах. За показником радіальної швидкості росту культури *S. crispa* можна віднести до грибів, що ростуть дуже повільно, в межах 0,5–2,8 мм/добу. Для всіх штамів найсприятливіми для вегетативного росту і формуванню генеративної стадії виявилися середовища – солодовий агар з додаванням тирси сосни (СС) і тирси модрина (СМ), температура інкубації $26 \pm 0,1$ °С. Критичними температурами для вегетативного росту штамів *S. crispa* 312 і 314 була температура $39 \pm 0,1$ °С, для штамів 304 і 2004 – температура $40 \pm 0,1$ °С. Видова приналежність штамів, яку визначили за морфологічними ознаками співпала із результатами ДНК-типуювання. Отримані в ході дослідження результати: мікро- і макроморфологічні характеристики, ростові показники, значення критичних температур можна використовувати як додаткові таксономічні характеристики виду *S. crispa* у вегетативній стадії розвитку. За результатами скринінгу штам *S. crispa* 314 відібрано як об'єкт для створення грибних біотехнологій та реінтродукції виду в природних умовах.

Ключові слова: штами *Sparassis crispa*; молекулярно-генетичні і морфолого-культуральні методи дослідження; сканувальна електронна мікроскопія; швидкість радіального росту; критичні температури

Вступ

У сучасному суспільстві надзвичайно зріс інтерес науковців й громадськості до проблем збереження біологічного різноманіття в цілому і особливо його раритетної складової. В останні десятиліття об'єктами соціологічних досліджень стали живі організми, охороні яких раніше невикористовувано не приділяли значної уваги. До таких організмів належать і представники царства грибів Fungi (Dudka, 2014). Одним із дієвих шляхів збереження біорізноманіття в Україні є формування списків і включення до «Червоних книг» рідкісних, зникаючих і вразливих видів рослин, грибів і тварин. Проте для дієвого збереження видів грибів і невиснажливого використання ресурсів мікобіоти цього недостатньо. Потрібно глибоко розуміти таксономічні, біологічні, екологічні особливості видів, вкрай важливо дослідити специфіку їх розвитку, динаміку та структуру популяцій, встановити умови зростання, оцінити вплив екологічних чинників середовища, і на основі отриманої інформації, передбачати і запроваджувати практичні зусилля зі збереження цих видів організмів (Diduch, 2009). Саме тому, підтримка рідкісних і зникаючих видів грибів у культурі в умовах спеціалізованих колекцій (*ex situ*) з метою збереження генофонду, пізнання різних аспектів біології цих організмів для наукових і практичних цілей розглядається на сьогодні нарівні з традиційним способом збереження *in situ* (Psurtseva, 2008).

В Україні, починаючи з кінця 60-х років минулого століття, культури базидієвих і сумчастих макроміцетів підтримуються в Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (ІБК), яка є об'єктом національного надбання України та внесена до міжнародної бази даних Всесвітньої федерації колекцій культур – WFCC (код доступу 1152; http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1152) (Lomberg et al., 2015; Bisko et al., 2016). Важливим напрямом роботи в колекції є введення в культуру і збереження рідкісних видів макроміцетів мікобіоти України. При цьому особлива увага приділяється культурам видів грибів, занесених до «Червоної книги України» (Lomberg et al., 2015, Bisko et al., 2016). Одним з таких видів є *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr., який має природоохоронний статус «зникаючий». Це реліктовий вид з диз'юнктивним ареалом, трапляється він в Євразії та Північній Америці. В Україні його часом знаходять у Карпатах, Західно-українських лісах, на Поліссі, в Лісостепу та Гірському Криму. Плодові тіла з'являються в липні – листопаді на корінні, біля основи стовбурів, зрідка на пенях сосни. Це сапротроф або слабкофітопатогенний гриб, що спричиняє жовто-буру гниль; паразитує він на сосні та руйнує залишки її деревини (Diduch, 2009).

S. crispa – цінний їстівний лікарський гриб, відомий у медичній практиці як «гриб-баран» (Wasser 2010, 2014; Choi et al., 2013; Hu et al., 2016). У народній медицині східних слов'ян настої його плодових тіл застосовували при лікуванні захворювань печінки та жовчного міхура (Buchalo et al., 2011). Сучасні відомості щодо лікувальних властивостей *S. crispa* свідчать про широкий біологічний спектр дії цього гриба (Tada et al., 2007; Dalonso et al., 2015). Встановлено, що екстракти, отримані як з плодових тіл, так і міцеліальної маси даного виду, мають імуномодулюючий, онкостатичний і антиметастатичний ефекти (Woodward et al., 1993; Kwon et al., 2009; Yamamoto et al., 2009; Yoshikawa et al., 2010; Takashi, 2013). За умов глибинного і поверхневого культивування штами *S. crispa* здатні до біосинтезу антибіотиків і цитокінінів (Dyakov et al., 2011; Vedenicheva et al., 2016).

Виявлено здатність *S. crispa* продукувати значну кількість полісахаридів, зокрема β -(1 \rightarrow 3)-глюканів (Tada et al., 2007, Kimura et al., 2013). Сьогодні цей вид розглядають як перспективний об'єкт для біотехнології отримання не лише їстівних плодових тіл, а і як джерело β -глюканів у промислових масштабах (Nadara et al., 2003; Kim et al., 2013; Takashi, 2013; Yang et al., 2014).

Пріоритетним завданням колекцій культур макроміцетів є збереження штамів грибів *ex situ* - підтримка їхньої чистоти, генетичної стабільності, життєздатності і біологічної активності (Smith, 2003; Smith et al., 2004; Psurtseva, 2008). Визначним етапом при цьому є правильна ідентифікація штамів за певними морфолого-культуральними видовими ознаками. При підтримці штамів в колекціях тривалий термін під час пересівів можлива підміна одного виду іншим, саме тому необхідно проводити верифікацію колекційних культур за чітко встановленими культуральними характеристиками. Підґрунтям для коректної верифікації базидієвих макроміцетів у вегетативній стадії розвитку є комплекс культуральних ознак, які мають таксономічне значення (Buchalo, 1988; Psurtseva, 2008; Buchalo et al., 2011) Метою нашої роботи було встановлення додаткових таксономічних характеристик штамів цінного їстівного лікарського гриба *S. crispa* у вегетативній стадії розвитку за допомогою молекулярно-генетичних і морфолого-культуральних методів.

Матеріал і методи досліджень

Об'єктами досліджень були чотири штами *S. crispa* (табл. 1) які зберігаються у Колекції культур шапинкових грибів (ІБК) (Bisko et al., 2016).

Таблиця 1. Список досліджених штамів *Sparassis crispa*

№ п/п	Штам	Рік виділення, джерело походження культури
1	304	1966, Колекція культур Інституту лісу, Еберсвальде, Німеччина
2	312	1967, Колекція культур базидіоміцетів Інституту мікробіології, Прага, Чеська Республіка
3	314	1959, Колекція культур базидіоміцетів Інституту мікробіології, Прага, Чеська Республіка
4	2004	2007, Колекція культур Московського державного університету імені М.В. Ломоносова, Москва, Російська Федерація

Видову приналежність культур визначали морфолого-культуральними та молекулярно-генетичними методами. Молекулярно-генетичні дослідження були проведені на базі Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного (Київ, Україна) та компанії L.F. Lambert Spawn Co. (Коатсвіль, США). Згідно з усталеною практикою джерелом ДНК у мікологічних дослідженнях виступала чиста аксенічна культура (Kumar and Shukla, 2005). В дослідженні використовували 20 добовий вегетативний міцелій штамів *S. crispa*. Екстракцію ДНК дослідженої культури здійснювали за модифікованою експрес-методикою, запропонованою дослідниками (Dörnte et al., 2013). Підготовлені заморожені зразки ДНК передавали для подальших молекулярних досліджень до лабораторії компанії L.F. Lambert Spawn Co. (Коатсвіль, Пенсильванія, США). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали в ампліфікаторі T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США), використовуючи стандартний протокол для ділянок внутрішнього транскрибуючого спейсера (ITS) у грибів (Kumar and Shukla, 2005). Для підтвердження успішності проведеної ампліфікації здійснювали гель-електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в 1%-му агарозному гелі на основі буферу 1xSB (борат натрію, Faster Better Media LLC, Хант Велі, США) при напрузі 120V у PowerPac™ Basic (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США). Візуалізацію продуктів ПЛР проводили в транс-ілюмінаторі Universal Hood 75S (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США). Ампліфікований продукт PCR очищали від залишків полімеразної суміші за допомогою креветкової 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 ПЛР секвенували методом Сенгера з використанням праймеру ITS4 у PrimBio Research Institute (Екстон, США). Послідовності були відредаговані та вирівняні з використанням програмного пакету Geneious v. 8.1.8 (Biomatters LTD, Окленд, Нова Зеландія).

Аналіз послідовностей. Верифікацію штамів 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 Здоров'я США GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Морфолого-культуральні дослідження проводили у чашках Петрі на стандартних і модифікованих агаризованих живильних середовищах різного складу – мальць екстракт агарі (МЕА), картопляно-декстрозному агарі (КДА), солодовому агарі (8 ° по Балінгу) (СА), солодовому агарі з додавання тирси сосни (1 %) (СС), солодовому агарі з додаванням тирси модрина (1 %) (СМ), солодовому агарі з додаванням тирси вишні (1 %) (СВ) та глюкозо-пептон-дріжджовому агарі (ГПДА), г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 5,0; дріжджовий екстракт – 3,0; КН₂РО₄ – 1,0; К₂НРО₄ – 1,0; MgSO₄ – 0,25; агар-агар – 20, рН 5,5. Культивування проводили за температури 26 ± 0.1 °С. Для отримання генеративної стадії чашки Петрі після повної їх колонізації міцелієм розміщували за умов денного освітлення. Для перевірки життєздатності культур їх інкубували на СМ, СС, СВ за температур 30–40 °С з кроком 1 ± 0.1 °С. Після третьої доби інкубації враховували наявність чи відсутність росту міцелію. Збереження або втрату життєздатності міцелію культур перевіряли при подальшому інкубуванні за температури 26 ± 0.1 °С. Радіальну швидкість росту розраховували за стандартною методикою (Bisko et al., 2012).

Мікро- і макроморфологічні особливості міцелію визначали на чотиритижневих колоніях за стандартними методиками, запропонованими П. Сталперсом (Stalpers, 1978). Макроморфологічна характеристика колонії включала в себе опис: текстури міцеліальної колонії і її колір, запах міцелію, колір реверзума, мікроморфологічна – опис характерних

особливостей гіфальної системи, наявність на міцелії пружок і анаморф. Мікроструктури вегетативного міцелію *S. crispa* досліджували у світловому мікроскопі „МБИ-15” (Росія), а також у сканувальному електронному мікроскопі „JSM-35C” (Японія), використовуючи модифікований метод Е. Квательбаума і Г. Карнера (Buchalo, 1988).

Статистичне оцінювання одержаних результатів виконували стандартними методами з використанням t-критерію Стьюдента за допомогою програмного забезпечення *Microsoft Excel*.

Результати та обговорення

Всі досліджені штами *S. crispa*, окрім штаму 2004, підтримувались у Колекції культур (IBK) понад 45 років, а штаму 314 понад 50 років (Bisko et al., 2016), тому перед проведенням подальших досліджень необхідно було провести верифікацію цих штамів. Підтвердження видової приналежності штамів *S. crispa* проведено як із застосуванням молекулярно-генетичних, так і морфолого-культуральних методів дослідження. Для всіх штамів *S. crispa* проведено повне визначення нуклеотидних послідовностей внутрішнього транскрипційного спейсеру: ITS1, 5.8S та ITS2 регіонів рРНК, а також часткове визначення 18S та 28S послідовностей, що оточують ITS. В результаті пошуку у генбанку, депоновані там послідовності зразків *S. crispa* показали 99-98% ідентичності з отриманими нами послідовностями, підтвердивши, тим самим, систематичний статус досліджених штамів (табл.2).

Таблиця 2. Верифікація видової приналежності штамів *Sparassis crispa* методом ДНК-типування

Штам	Найблищий штаму з бази даних NCBI (Taxonomy ID)	Ідентичність, %
304	GenBank: KC987558 1) CBS:716.94 clone C3	99
312	CBS 830.91	99
314	voucher BRMN 686439	98
2004	voucher BRMN 686439	99

На основі отриманих нуклеотидних послідовностей досліджені штами *S. crispa* зареєстровано у генбанку: *S. crispa* 304 – код доступу MG323885, *S. crispa* 312 – код доступу MG 266906, *S. crispa* 314 – код доступу MG323886, *S. crispa* 2004 – код доступу 323887. Паралельно із молекулярно-генетичними дослідженнями нами було проведено додаткову верифікацію всіх штамів *S. crispa* за класичними морфолого-культуральними ознаками. Досліджено мікро- і макроморфологію вегетативного міцелію за сукупністю ознак на стандартному живильному середовищі за традиційною класифікацією П. Сталперса (Stalpers, 1978), визначено ростові показники (радіальна швидкість росту), встановлено критичні температури, підібрано умови для отримання генеративної стадії *ex situ*.

Однією з найважливіших таксономічних ознак під час ідентифікації базидієвих макроміцетів у культурі є наявність пружок, які утворюються на міцелії багатьох представників цієї групи грибів (Stalpers, 1978; Buchalo et al., 2011). Різні види характеризуються певними відмінностями у розташуванні пружок на гіфах, за частотою їх трапляння, формою, розмірами тощо (Buchalo et al., 2009). Для всіх досліджених штамів *S. crispa* були характерні гіфи з регулярними односторонніми пружками без зазору (рис. 1, а). Вегетативний міцелій складався переважно з помірно розгалужених, регулярно септованих, незабарвлених генеративних гіф діаметром 1,5–3 мкм. Вони утворювали численні анастомози, міцеліальні тяжі (рис.1 б), зливались між собою формуючи міцеліальні плівки (рис. 2, а).

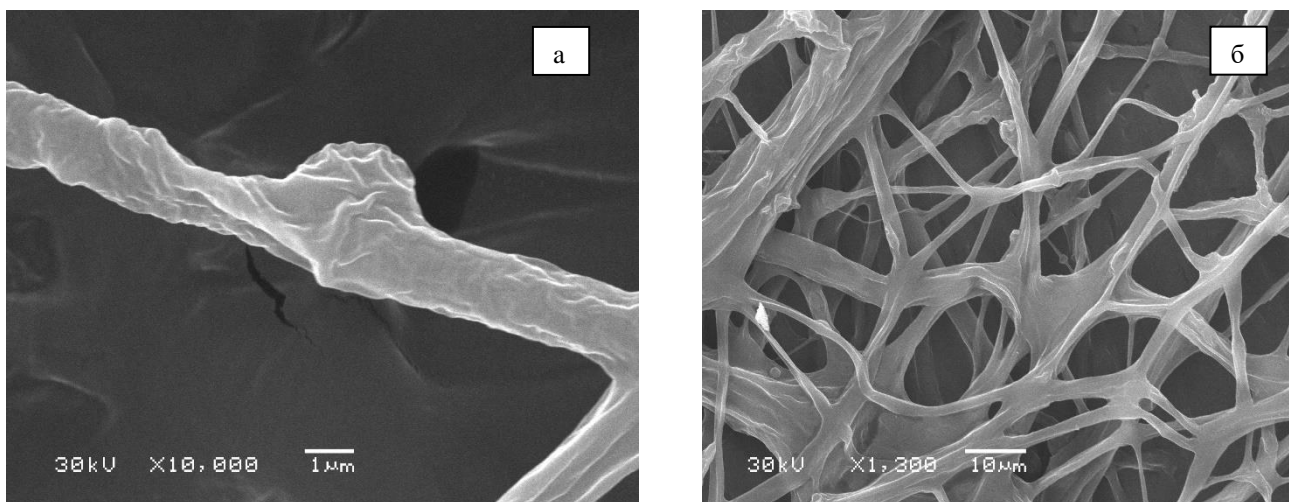


Рис.1. *Sparassis crispa*. а – пружка на гіфі без зазору, б – анастомози, міцеліальні тяжі, міцеліальні плівки (розмір штриха: а – 1 мкм, б – 10 мкм)

За даними літератури (Dyakov et al., 2011), для *S. crispa* характерні краплеподібні секреторні клітини на поверхні гіф і утворення кристалів різноманітної форми (голчасті, зібрані в пучки, тетраедричні). В умовах нашого експерименту кристали не формувались, але було виявлено численні секреторні клітини на поверхні гіф (рис. 2 б).

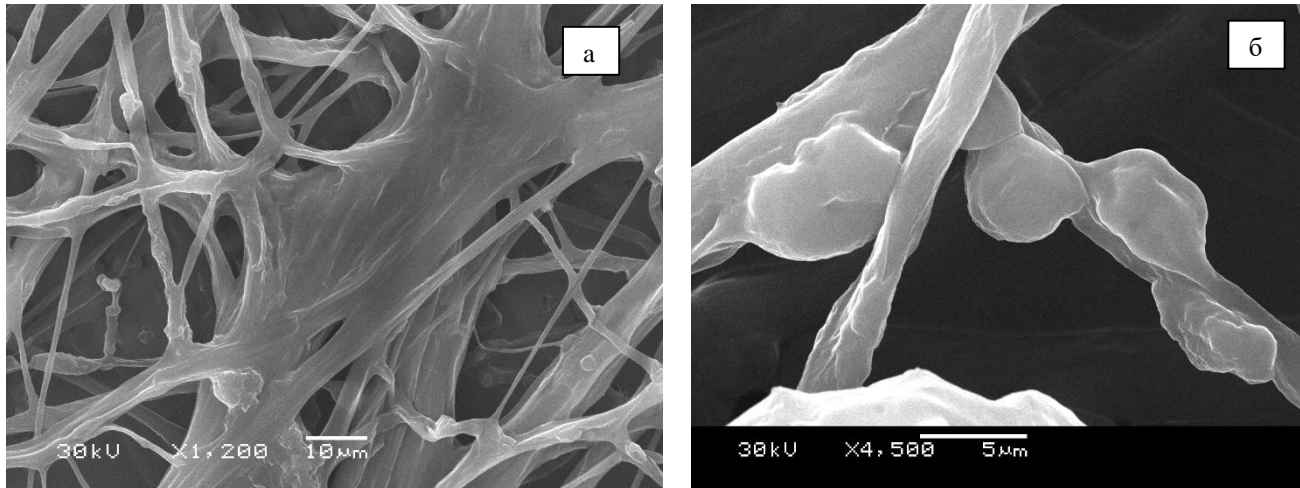


Рис. 2. *Sparassis crispa*. а – міцеліальна плівка, б – секреторні клітини (розмір штриха: а – 10 мкм, б – 5 мкм)

Досліджено морфолого-культуральні особливості штамів на агаризованих живильних середовищах різного складу. Це дало можливість виявити макроморфологічні особливості міцеліальних колоній, підібрати оптимальні живильні середовища для культивування та збереження штамів у належному фізіологічному стані.

У результаті проведених досліджень виявлено мінливість морфологічних ознак колоній залежно від складу середовища. На зазначених вище живильних середовищах формувалися колонії двох основних типів:

1) щільні, непрозорі, оксамитові, білого кольору, притиснуті до субстрату, край рівний, колір реверзumu збігався із забарвленням середовища, ексудат відсутній. Міцелій мав своєрідний грибний аромат (рис. 3, а).

2) колонії дуже розріджені, прозорі, повстисті або порошисті, білого кольору з незначною кількістю коротких, повітряних гіф, край колонії рівний, притиснутий до субстрату, колір реверзumu збігався із забарвленням середовища, ексудат відсутній (рис. 3, б). Міцелій мав грибний аромат.

Висота і щільність колоній, здатність утворювати генеративну стадію варіювали залежно від складу живильного середовища. Формуванню щільних колоній 1 типу сприяли натуральні середовища із додаванням рослинних домішок – СС, СМ та СВ. Два перших з них виявилися найсприятливішими для росту (рис. 3, а). Найменш придатними для культивування були середовища МЕА, КДА і ГПДА, на них досліджені штами формували дуже розріджені колонії 2 типу, а їх діаметр навіть на 45-ту добу культивування не перевищував 70 мм (рис. 3, б).

Слід зазначити, що утворення генеративної стадії у чистій культурі є одним із надійніших критеріїв для підтвердження таксономічного статусу штаму на рівні виду (Buchalo, 1988). У зв'язку з цим, при підтримці культур в умовах колекції, утворення плодових тіл набуває особливого значення. Нами підібрано склад живильних середовищ (СС, СМ і СВ), які сприяли формуванню плодових тіл штамми з колекції *ІВК*.

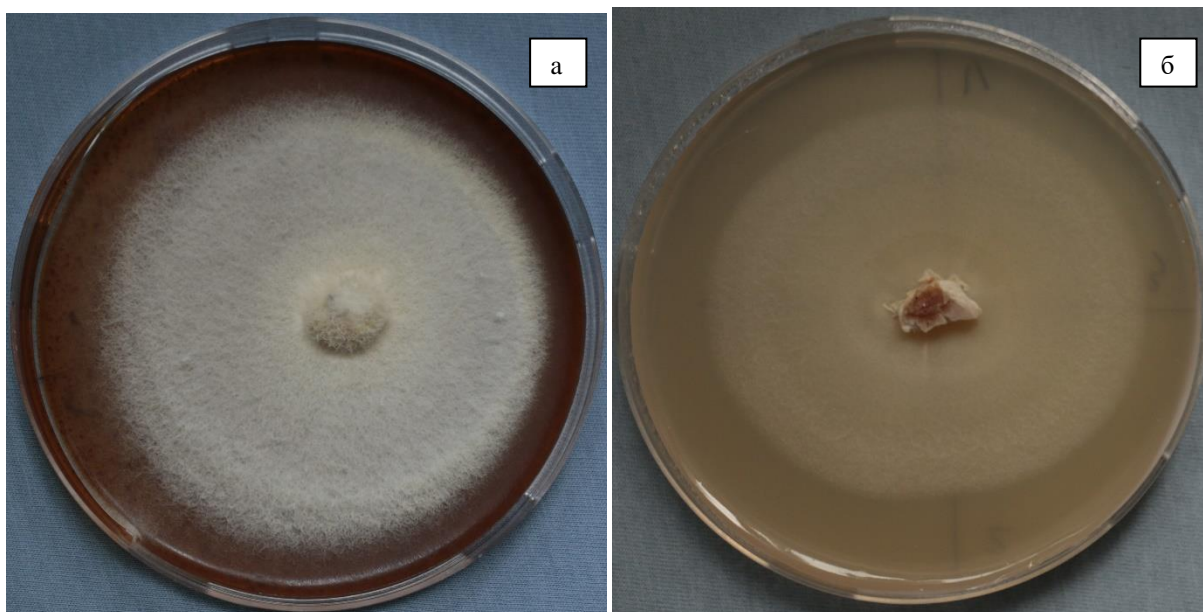


Рис. 3. Міцеліальні колонії *Sparassis crispa* на агаризованих живильних середовищах: а – на СС, б – на МЕА за температури інкубації $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Повне обростання чашок із живильним середовищем (СС, СМ та СВ) відбувалось на 30 добу, після чого їх залишали за умов денного освітлення і температури 20–22 °С. На 50–55 добу починали формуватись примордії, які розвивались у зрілі плодові тіла (рис. 4). Здатність *S. crispa* утворювати генеративну стадію в культурі на певних середовищах можна використовувати для верифікації штамів даного виду в колекціях.



Рис. 4. *Sparassis crispa*: стадія телеоморфи на агаризованому середовищі СС (60 доба культивування).

За даними літератури (Psurtseva, 2007), процес утворення плодових тіл *ex situ* досліджували у понад 55 видів агарикоїдних, афілофороїдних і деяких гетеробазидієвих грибів. Найбільш дослідженими є широковідомі їстівні лікарські гриби, що культивуються: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Lentinula edodes* (Berk.) Singer, *L. tigrinus* (Bull.) Fr., а також модельні об'єкти для експериментальних робіт *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. і види роду *Coprinus* Pers. На підставі встановлених морфологічних характеристик міцеліальних колоній *S. crispa*, а також отриманої генеративної стадії *ex situ* підтверджено видову приналежність усіх досліджених штамів.

На думку відомого міколога М. Ноблза (Nobles, 1971), ізоляти одного й того ж виду можуть значно різнитися за кольором, текстурою колоній, а більш сталими ознаками є міроморфологічні особливості гіфальної системи, швидкість росту, відношення до температури. Крім того, швидкість росту вегетативного міцелію, поряд зі здатністю до біосинтезу тих чи інших метаболітів, є важливим критерієм характеристики штамів.

За даними літератури, на швидкість росту істотно впливають склад живильних середовищ і температура інкубації (Solomko, 2000). Відомості щодо ростових характеристик виду *S. crispa* на агаризованих живильних середовищах досить обмежені.

Ми дослідили ріст чотирьох штамів на семи різних за складом агаризованих живильних середовищах (МЕА, КДА, ГПДА, СА, СС, СВ, СМ). Ріст міцелію відбувався на всіх випробуваних середовищах. Досліджені штами *S. crispa* за показником радіальної швидкості росту можна віднести до грибів, що ростуть дуже повільно, в межах 0,5–2,8 мм/добу (рис. 5).

В літературі представлено результати впливу джерел вуглецевого і азотного живлення, кислотності середовища, температури інкубації на ріст міцеліальних колоній штамів *S. crispa* (Faroog et al., 2014; Shim et al., 1998).

Проте, автори наводять лише розмір діаметру міцеліальної колонії *S. crispa* на 28 добу культивування – 67 мм (КДА) (Faroog et al., 2014), на 15 добу культивування – 27 мм - на середовищі з мальтозою (Shim et al., 1998), або на 7 добу культивування ≤ 10 мм (СА) (Dyakov et al., 2011), що ускладнює порівняння результатів, оскільки наведені різні значення діб культивування культур, але певну закономірність можна простежити. Усі штами ростуть дуже повільно.

За даними наших досліджень максимальну швидкість росту *S. crispa* забезпечували середовища СМ та СС. Найвищі ростові показники були характерні для штамів 314 та 312 (рис.5). Таким чином, отримані результати порівняльного дослідження чотирьох штамів *S. crispa* виявили різницю у морфолого-культуральних ознаках цих культур (висота, щільність колонії, швидкість радіального росту, морфологія колоній) залежно від складу живильних середовищ. Доцільно рекомендувати середовище СС для збереження культур *S. crispa* у колекції за певних еталонних умов. Це середовище не лише забезпечує максимальний ріст культур, але й збереження фізіологічних та морфологічних особливостей штамів цього виду.

Досліджено вплив критичних температур на життєздатність вегетативного міцелію. Досліджені штами *S. crispa* при підвищенні температури інкубації до 34±0,1 °С не росли, проте вони не втрачали своєї життєздатності і відновлювали ріст при перенесенні їх за умов 26±0,1 °С протягом тижня. Температура 39±0,1 °С з експозицією 3 доби для штамів 312 і 314 виявилась критичною. Штами 304 і 2004 втрачали життєздатність за температури 40±0,1 °С. Таким чином, відношення до критичних температур є певною ознакою окремого штаму.

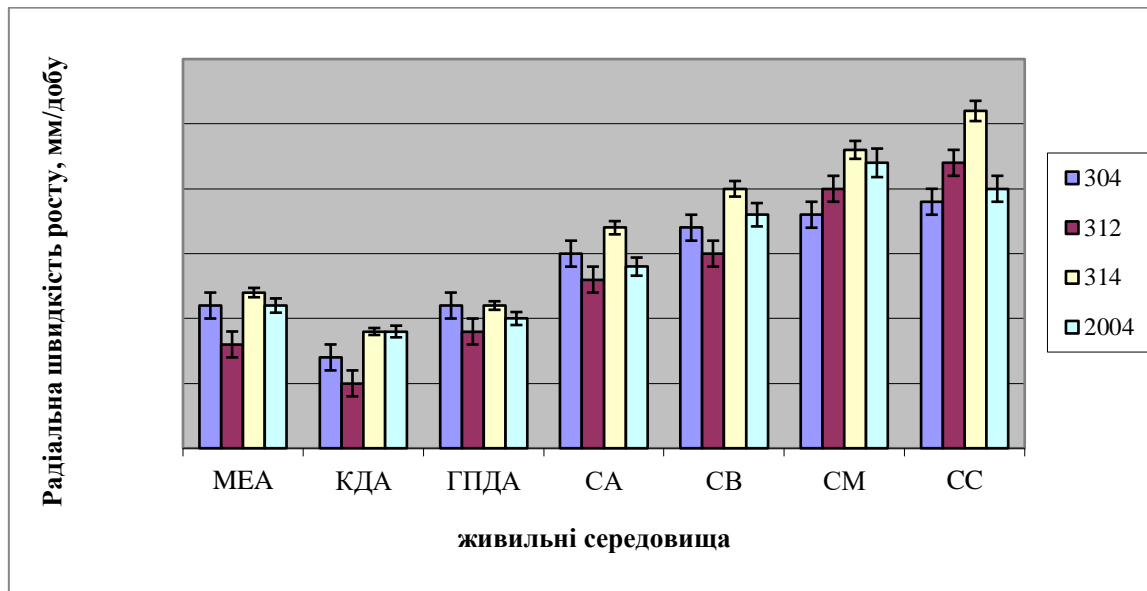


Рис. 5. Швидкість радіального росту штамів *Sparassis crispa* на агаризованих живильних середовищах різного складу за температури інкубації $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Висновки

Проведено верифікацію чотирьох штамів *S. crispa* із застосуванням молекулярно-генетичних і морфолого-культуральних методів дослідження. Видова приналежність всіх досліджених штамів, визначена за морфологічними ознаками, повністю співпала з результатами ДНК-типуювання (рівень гомології 98-99%). На основі отриманих нуклеотидних послідовностей досліджені штами *S. crispa* зареєстровано у генбанку – NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>): *S. crispa* 304 – код доступу MG323885, *S. crispa* 312 – код доступу MG 266906, *S. crispa* 314 – код доступу MG323886, *S. crispa* 2004 – код доступу 323887.

Встановлено морфолого-культуральні ознаки штамів цінного їстівного лікарського гриба *S. crispa*, які можна використовувати як основні таксономічні характеристики для даного виду, а саме: наявність на гіфах регулярних односторонніх пружок без зазору, численних секреторних клітин, анастомозів, міцеліальних тяжів, плівок, утворення генеративної стадії в умовах культури на середовищах певного складу. Отримано дані про ріст і морфологію міцеліальних колоній на живильних агаризованих середовищах різного складу. За величиною швидкості росту досліджені штами можуть бути віднесені до групи грибів, що ростуть дуже повільно (0,5–2,8 мм/добу). Встановлено склад живильних середовищ (CC, CB, CM) які стимулюють утворення генеративної стадії *ex situ*. Підібрано склад середовища (солодовий агар з додаванням тирси сосни) для культивування та збереження штамів у належному фізіологічному стані в умовах колекції.

За комплексом морфолого-культуральних ознак підтверджено видову приналежність штамів їстівного лікарського гриба *S. crispa*, які зберігаються у Колекції культур шапинкових грибів (ІБК).

Отримані результати можна використовувати для створення біотехнології культивування штамів цінного їстівного лікарського гриба *S. crispa* з метою отримання біологічно активних речовин широкого спектру дії. Крім того, зважаючи на те, що даний вид занесений до «Червоної книги України» і має природоохоронний статус «зникаючий», результати досліджень мають важливе значення для реінтродукції даного виду в природні умови України.

Подяки

Автори висловлюють щирю подяку В.І. Сапсаю (Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України) за допомогу в проведенні зйомок мікроструктур вегетативного міцелію під сканувальним електронним мікроскопом.

References

- Bisko, N. A., Lomberg, M. L., Mytropolska, N. Yu., & Mykchaylova, O. B. (2016). The IBK mushroom culture collection. Kyiv, M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kyiv, Alterpres.
- Bisko, N.A., Lomberg, M.L., Mykchaylova, O.B., Mytropolska, N.Yu., Al-Maali, G. (2016). Ex situ conservation of rare species of macromycetes in the IBK culture collection of mushrooms. Rare plants and fungi of Ukraine and adjacent areas: implementing conservation strategies. Kyiv: Palyvoda (in Ukrainian).

- Bisko, N.A., Babitskaya, B.G., Buchalo, A.S., Lomberg, M.L., Mykchaylova, O.B., Puchkova, T.A., Solomko, E.F., Scherba, V.V. (2012). Biologicheskie osobennosti lekarstvennyh makromicetov v kul'ture: Sbornik nauchnyh trudov v dvuh tomah. Volume 2 [Biological features of medicinal macromycetes in culture: Collection of scientific works in two volumes]. Alterpres, Kyiv (in Russian).
- Buchalo, A.S. (1988). Higher edible Basidiomycetes in pure culture. Naukova dumka, Kiev (in Russian).
- Buchalo, A., Mykchaylova, O., Lomberg, M., Wasser, S. P. (2009). Microstructures of vegetative mycelium of Macromycetes in pure cultures. M.G. Kholodny Institute of Botany.
- Buchalo, A.S., Babitskaya, B.G., Bisko, N.A., Wasser, S.P., Dudka, I.A., Mytropolska, N.Yu., Mykchaylova, O.B., Poyedinok, N.L. (2011). Biologicheskie osobennosti lekarstvennyh makromicetov v kul'ture: Sbornik nauchnyh trudov v dvuh tomah. Volume 1 [Biological features of medicinal macromycetes in culture: Collection of scientific works in two volumes.]. Alterpres, Kyiv (in Russian).
- Buchalo, A.S., Mytropolska, N.Yu., Mykchaylova, O.B. (2011). The catalogue of the culture collection of mushrooms. Kyiv: Alterpress (in Russian).
- 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. In Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7).
- Choi, W. S., Shin, P. G., Bok, Y. Y., Jun, N. H., & Kim, G. D. (2013). Anti-inflammatory effects of *Sparassis crispa* extracts. Journal of Mushroom, 11(1), 46-51, <http://doi:10.14480/JJM.2013.11.1.046>
- Dalonso, N., Goldman, G. H., & Gern, R. M. M. (2015). β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. Applied microbiology and biotechnology, 99(19), 7893-7906. <http://doi:10.1007/s00253-015-6849-x>.
- Diduh, Ya. P. (2009). Red Data Book of Ukraine. Plantage. Kyiv, Globalkonsaltyng, (in Ukrainian).
- Dörnte, B., & Kües, U. (2013). Fast microwave-based DNA extraction from vegetative mycelium and fruiting body tissues of Agaricomycetes for PCR amplification. Curr Trends Biotechnol Pharm, 7, 825-836.
- Dyakov, M.Yu., Kamzolkina, O.V., Shtaer, O.V., Bisko, N.A., Poyedinok, N.L., Mykchaylova, O.B., Tikhonova, O.V., Tolstikhina, T.E., Vasil'eva, B.F., and Efremenkova, O.V.(2011). Morphological Characteristics of Natural Strains of Certain Species of Basidiomycetes and Biological Analysis of Antimicrobial Activity under Submerged Cultural Conditions. Microbiology, 80(2), 274–285. <http://dx.doi.org/10.1134/S0026261711020044>
- Dudka, I.O. (2014). Disputable items of conservation and inclusion in the Red Data Book of Ukraine of micromycetes and fungi-like organisms. Flora in the Red Data book of Ukraine: implementation of the global strategy for plant conservation. Lviv (in Ukrainian).
- Farooq, M.U., Chioza, A., Ohga, S. (2014). Vegetative Development of *Sparassis crispa* in Various Growth Conditions and Effect of Electric Pulse Simulation on Its Fruit Body Production. Advances in Microbiology. 4, 267–274. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2014.45033>
- Hadara, T., Miura, N.N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., Ohno, N. (2003). Antibody to soluble 1,3/1,6- β -D-glucan, SCG in Sera of Naïve DBA/2 Mice. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26, 1225–1228. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.26.1225>
- Hu, S., Wang, D., Zhang, J., Du, M., Cheng, Y., Liu, Y., Zhang, N., Wang, D., Wu, Y.(2016). Mitochondria Related Pathway Is Essential for Polysaccharides Purified from *Sparassis crispa* Mediated Neuro-Protection against Glutamate-Induced Toxicity in Differentiated PC12 Cells. Int. J. Mol. Sci. 17(2), 133. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17020133>
- Kim, S.R., Kang, H.W., Ro, H.S. (2013). Generation and evaluation of high β -glucan producing mutant strains of *Sparassis crispa*, Mycobiology. 41,159–163.
- Kimura, T. (2013). Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Sparassis crispa*. BioMed Res Int 2013:982317 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/982317>
- 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.2.662-668.2005>
- Kwon A.H., Qiu Z., Hashimoto M., Kimura T. (2009). Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. The American journal of Surgery. 197, 503–509. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2007.11.021>;
- Lomberg, M. L., Mykchaylova, O. B., & Bisko, N. A. (2015). Kolekcija kul'tur shapynkovykh grybiv (IBK) yak 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). <http://dx.doi.org/10.15407/ukrbotj72.01.022>
- Nobles, M. K. (1971). Cultural characters as a guide to the taxonomy of the Polyporaceae. Evolution in the higher Basidiomycetes.
- Psurtseva, N.V., Kiyashko, A.A., Shakhova, N.V. (2007). Ekologo-taksonomicheskie predposylki polucheniya plodovikh tel. v kul'ture u makromitsetov, predstavlyayushchikh interes dlya meditsiny, Uspikhi meditsinskoy mikologii, IX, 254–258. (in Russia).
- Psurtseva, N.V. (2008). Cultural characteristics as the basis for verification of macromycetes while maintaining ex situ. Vysshie bazidialnyie gribyi: individuymi, populyatsii, soobschestva: materialy yubileynoy konfer., posvyasch. 110-letiyu M.V. Gorlenko. Moscow (in Russia).
- Shim, J.O., Son, S.G., Yoon, S.O., Lee, Y.S., Lee, T.S., Lee, S.S., Lee, K.D., Lee, M.W. (1998). The optimal Factors for the Mycelial Growth of *Sparassis crispa*. Korean J. Mycol, 26(1), 39–46.
- Smith, D.(2003). Culture collections over the world. Int. Microbiol, 6, 95–100.

- Smith, D., Ryan, M.J. (2004). Current status of fungal collections and their role in biotechnology (pp. 527-538). In: "Handbook of fungal biotechnology" D.K. Arora (Ed.) New York: Marcel Dekker, Inc.
- Solomko, E. F., Lomberg, M. L., & Mytropolska, N. Ju. (2000). Rist okremykh vydiv likars'kyh makromicetiv na zhyvyl'nyh seredovyshhah 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.
- Tada, R., Harada, T., Nagi-Miura, N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., & Ohno, N. (2007). NMR characterization of the structure of a β -(1→3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*. Carbohydrate Research, 342(17), 2611-2618. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.08.016>
- Takashi, K. (2013). Natural Products and Biological Activity of the Pharmacologically Active Cauliflower Mushroom *Sparassis crispa*. BioMed Research International, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/982317>
- Vedenicheva, N.P., Al-Maali, G., Mytropolska, N.Yu., Mykchaylova, O.B., Bisko, N.A., Kosakivska, I.V. (2016). Endogenous cytokinins in medicinal basidiomycetes mycelial biomass. Biotechnologia acta, 9(1), 55–63. <http://dx.doi.org/10.15407/biotech.9.01.055>
- Wasser, S. P. (2014). Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. Biomed J, 37(6), 345-56. <http://dx.doi.org/10.4103/2319-4170.138318>
- Wasser, S.P. (2010). Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems. Int. J. Med. Mushrooms, 12(1), 1–16.
- Woodward, S., Sultan, H. Y., Barrett, D. K., & Pearce, R. B. (1993). Two new antifungal metabolites produced by *Sparassis crispa* in culture and in decayed trees. Microbiology, 139(1), 153-159.
- Yamamoto, K., Kimura, T., Sugitachi, A., & Matsuura, N. (2009). Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of β -1, 3-D-glucan purified from *Hanabiratake*, *Sparassis crispa*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 32(2), 259-263.
- Yang, Y.H., Kang, H-W., Ro, H.S. (2014). Cloning and molecular characterization of β -1,3-glucan synthase from *Sparassis crispa*. Mycobiology, 42(2), 167–173. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.2.167>
- Yoshikawa, K., Kokudo, N., Hashimoto, T., Yamamoto, K., Inose, T., Kimura, T. (2010). Novel Phthalate Compounds from *Sparassis crispa* (*Hanabiratake*), *Hanabiratakelide A-C*, exhibiting anticancer related activity. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 33(1), 1355–1359. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.1355/>

Citation:

Mykchaylova, O.B., Gryganskyi, A.P., Lomberg, M.L., Bisko, N.A. (2017). The study of morphological and cultural properties of *Sparassis crispa* (*Sparassidaceae*, *Polyporales*). *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(4), 550–558.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License